

Aus dem Bereich Molekulare Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zu G-  
Protein-gekoppelten Signalwegen in adulten Herzmuskelzellen**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften***

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von Silke Wegener  
geboren am 22.12.1982 in Zweibrücken

# **I. Inhaltsverzeichnis**

## **II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... V**

### **1. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY ..... - 1 -**

### **2. EINLEITUNG ..... - 6 -**

2.1	Aufbau und Funktion des Herzens .....	- 6 -
2.2	Elektrische Aktivität des Herzens .....	- 8 -
2.3	Mechanismus der Kontraktion im quergestreiften Muskel .....	- 9 -
2.4	Kalzium-Signale in Kardiomyozyten .....	- 10 -
2.4.1	Erregungs-Kontraktions-Kopplung .....	- 11 -
2.4.2	Erregungs-Transkriptions-Kopplung.....	- 13 -
2.5	G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion in Kardiomyozyten und die Entstehung von Hypertrophie .....	- 15 -
2.6	Protein Kinase C Familie .....	- 18 -
2.6.1	Domänenstruktur der PKC .....	- 19 -
2.6.2	Regulation .....	- 23 -
2.6.3	PKCs im Herzen .....	- 26 -
2.7	Ziele der Arbeit.....	- 29 -

### **3. MATERIAL & METHODEN ..... - 30 -**

3.1	Chemikalien .....	- 30 -
3.2	Messsysteme .....	- 32 -
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	- 32 -
3.4	Puffer und Lösungen .....	- 33 -
3.5	Nährmedien für Zell- und Bakterienkultur .....	- 35 -
3.6	Isolation und Kultivierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte.....	- 35 -
3.6.1	Zellisolation .....	- 36 -
3.6.2	Kultivierung .....	- 36 -
3.7	Herstellung von Adenovirusvektoren .....	- 37 -
3.7.1	Virusamplifikation.....	- 39 -
3.7.2	Reinigung adenoviraler Vektoren durch CsCl-Gradientenzentrifugation .....	- 40 -
3.7.3	Virustiterbestimmung .....	- 42 -
3.8	Molekularbiologische Methoden.....	- 43 -

3.8.1	Restriktion von Plasmid-DNS .....	- 43 -
3.8.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS .....	- 44 -
3.8.3	Isolation von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel .....	- 44 -
3.8.4	Ligation von DNS-Fragmenten .....	- 45 -
3.8.5	Transformation von Bakterien .....	- 45 -
3.8.6	Isolation von Plasmid-DNS aus Bakterien .....	- 46 -
3.8.7	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	- 46 -
3.8.8	Klonierung von Fusionsproteinen .....	- 46 -
3.8.9	Zielgerichtete Mutagenese .....	- 47 -
3.8.10	Polymerase-Kettenreaktion .....	- 48 -
3.8.11	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	- 51 -
3.9	Zellbiologische Methoden.....	- 63 -
3.9.1	Kultivierung von adhärenenten eukaryontischen Zellen .....	- 63 -
3.9.2	Transfektion eukaryontischer Zellen .....	- 63 -
3.9.3	Transduktion von primären Zellen .....	- 64 -
3.9.4	Immunfluoreszenz .....	- 65 -
3.9.5	Kalziummessungen mit Fura-2.....	- 66 -
3.9.6	Sarkomerlängenmessungen.....	- 69 -
3.10	Proteinbiochemische Methoden .....	- 71 -
3.10.1	Proteinpräparation aus eukaryontischen Zellen.....	- 71 -
3.10.2	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	- 71 -
3.10.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	- 71 -
3.10.4	Immunoblot-Analyse (Western Blot).....	- 72 -
3.10.5	Immunpräzipitation .....	- 75 -
3.10.6	Protein Kinase-Aktivitätstest.....	- 76 -
3.11	Konfokalmikroskopie.....	- 78 -
<b>4.</b>	<b><u>ERGEBNISSE .....</u></b>	<b>- 80 -</b>
4.1	Genexpressionsanalyse von Kardiomyozyten nach chronischer hormoneller Stimulation mit Endothelin-1 und Phenylephrin .....	- 80 -
4.1.1	Auswahl geeigneter Housekeeping-Gene.....	- 80 -
4.1.2	Test auf Varianz in der Genexpression unterschiedlicher Ratten .....	- 82 -
4.1.3	Auswahl zu testender Gene und deren Analyse .....	- 84 -
4.2	Effekt der PKC <sub>1</sub> auf die Physiologie von Kardiomyozyten .....	- 91 -
4.2.1	Expression und Lokalisation der PKC <sub>1</sub> in Kardiomyozyten der Ratte .....	- 91 -
4.2.2	Lokalisation der PKC <sub>1</sub> in Kardiomyozyten nach virusvermitteltem Gentransfer.....	- 94 -

4.2.3	Herstellung und Funktionalität einer konstitutiv-aktiven sowie einer dominant-negativen PKC <sub>1</sub> -GFP Variante .....	- 98 -
4.2.4	Expression und Lokalisation der PKC <sub>1</sub> -GFP-Mutanten in Kardiomyozyten nach virusvermitteltem Gentransfer .....	- 103 -
4.2.5	Maß der Überexpression der PKC <sub>1</sub> bei der Durchführung der Kalzium- und Kontraktionsmessungen .....	- 110 -
4.2.6	Einfluss der PKC <sub>1</sub> auf den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten .....	- 112 -
4.2.7	Einfluss der PKC <sub>1</sub> auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten.....	- 118 -
<u>5. DISKUSSION.....</u>		<u>- 121 -</u>
5.1	Genexpressionsanalyse von Kardiomyozyten nach chronischer hormoneller Stimulation mit Endothelin-1 und Phenylephrin .....	- 121 -
5.1.1	Auswahl der zur Normierung verwendeten Housekeeping-Gene .....	- 122 -
5.1.2	Test auf Poolen.....	- 124 -
5.1.3	Genexpressionsanalyse .....	- 125 -
5.1.4	Ausblick.....	- 131 -
5.2	Effekt der PKC <sub>1</sub> auf die Physiologie von Kardiomyozyten .....	- 132 -
5.2.1	Lokalisation der PKC <sub>1</sub> in Ratten-Kardiomyozyten.....	- 132 -
5.2.2	Einfluss der PKC <sub>1</sub> auf das Kalzium- und Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten.....	- 141 -
5.2.3	Ausblick.....	- 146 -
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</u>		<u>- 148 -</u>
<u>7. DANKSAGUNG .....</u>		<u>X</u>
<u>8. LEBENSLAUF .....</u>		<u>XII</u>

## II. Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ]	Kalziumkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
A	Adenin-Nukleotid/Alanin
A <sub>260 nm</sub>	Absorption bei 260 Nanometern
A <sub>280 nm</sub>	Absorption bei 280 Nanometern
Actc1	kardiales alpha-Aktin
AM	Azetoxymethyl
Amp	Ampizillin
AOTF	Acusto optical tunable filter
aPKC	atypische PKC
APS	Ammoniumperoxisulfat
Arbp	saures ribosomales Phosphoprotein P0
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin-Nukleotid
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulin Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	„copy“ DNS
CICR	kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung
Cm	Chloramphenikol
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
CN	Calcineurin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid

cPKC	konventionelle PKC
cpm	counts pro Minute
CsCl	Cäsiumchlorid
C <sub>T</sub>	Cycle Threshold
CTD	Kalziumtransientendauer
DAG	Diazylglyzerol
DIV	Tage <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EC-Kopplung	Erregungs-Kontraktions-Kopplung
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykotetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Phenylalanin
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
g	Gramm/Erdbeschleunigung: 9,81m/s <sup>2</sup>
G	Guanin-Nukleotid/Glyzin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeazetylase

HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HK-Gen	Housekeeping-Gen
Hprt1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase1
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltriphosphat
IP3R	Insositoltriphosphat Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITS	Insulin-Transferrin-Selenit
K	Lysin
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
l	Liter
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNS	“messenger” RNS
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
Na-ATP	Natrium-ATP
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NCX	Natrium/Kalzium-Austauscher
NFAT	Kernfaktor aktivierter T-Zellen
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
nPKC	neue (novel) PKC
OD	optische Dichte
OD <sub>260 nm</sub>	optische Dichte bei 260 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Plaque forming units
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PLC	Phospholipase C
Prdx2	Peroxiredoxin-2
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	Arginin
RACK	Rezeptor für aktivierte C Kinasen
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
Rpl10a	ribosomales Protein L10a
rpm	Rotationen pro Minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese



SERCA	SR Kalzium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Thymin-Nukleotid
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tc	Tetrazyklin
Temed	Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TKR	Tyrosin Kinase Rezeptor
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
T-Tubuli	Transervaltubuli
U	Unit
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
W	Tryptophan
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein

## 1. Zusammenfassung/Summary

### **Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zu G-Protein-gekoppelten Signalwegen in adulten Herzmuskelzellen**

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören zu den 7-Transmembranrezeptoren. Zu ihnen zählen zum Beispiel die Rezeptoren für die Hormone Endothelin-1, Angiotensin-II und Phenylephrin, welche mit der Entwicklung von Pathologien im Herzen in Zusammenhang stehen. Nach Binden der Liganden an die entsprechenden Rezeptoren werden Signalwege ausgelöst, die unter anderem auch das Genexpressionsmuster durch Modulation der Transkription verändern. Bei chronischer hormoneller Stimulation werden Gene transkribiert, die zur Entstehung von Hypertrophie führen. Innerhalb dieser Signalwege kommt es zur Aktivierung von Phospholipasen C (PLC), Protein Kinasen C (PKC) wie auch Protein Kinasen D (PKD). Dabei führt die Aktivierung der PLC zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphat zu Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Diacylglycerol aktiviert Mitglieder der PKC Familie, die wiederum die PKD durch Phosphorylierung aktivieren können.

Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte wurden isoliert und über mehrere Tage kultiviert und mit 100 nM Endothelin-1 oder 100  $\mu$ M Phenylephrin durch Zugabe zum Medium stimuliert. Durch eine mRNS Transkriptionsanalyse wurden die Auswirkungen der hormonellen Stimulation auf die Transkription von PLC-, PKC- und PKD-Isozymen, sowie der SERCA-Pumpe analysiert. Die Zellen wurden hierfür an den Tagen 0, 1, 3 und 6 geerntet und mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf die Transkription der ausgesuchten Gene untersucht.

Hierbei wurde zunächst die Expression der PLCs  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\delta$ 3,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ 2, der PKCs  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\gamma$ , und der PKD3 in adulten Ratten-Kardiomyozyten nachgewiesen. Die Stimulation mit Endothelin-1 führte zu signifikanten Veränderungen in der Expression der PLCs  $\beta$ 1,  $\epsilon$  und  $\gamma$ 2, der PKCs  $\eta$  und  $\gamma$ , und der PKD3. Nach Phenylephrin-Stimulation wurden signifikante Änderungen in der Expression der

PLCs  $\beta 1$  und  $\gamma 2$ , der PKCs  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\gamma$ , der PKD3 und SERCA festgestellt. Für die meisten der Gene gab es Veränderungen über die Kultivierungsdauer, was bedeutet, dass sich die überprüften Zeitreihen in ihren Verlaufseigenschaften unterschieden. Nur für PKC $\gamma$  und SERCA lag eine Messreihe systematisch höher oder niedriger als die Kontrolle. Bei der PKC $\gamma$  führte die Behandlung mit Endothelin-1 zu einer Verringerung der Expression, während die Phenylephrin-Zugabe eine Erhöhung der PKC $\gamma$ -Expression zur Folge hatte. Die Expression der SERCA-Pumpe wurde durch Phenylephrin ebenfalls erhöht.

In einem zweiten Projekt wurde der Effekt der atypischen PKC $\iota$  auf die Physiologie adulter Kardiomyozyten untersucht. In der gesunden Herzmuskelzelle sind die PKCs an der Muskelkontraktion, der Reaktion der Muskelzellen auf extrazelluläre Stimuli (wie mechanische, hormonelle und Neurotransmitter-Stimulation), sowie an Zellwachstum und -überleben beteiligt (Malhotra *et al.*, 2001). Dabei sind die Funktionen der konventionellen PKCs und der „novel“ PKCs sehr gut untersucht, wohingegen für die atypischen Isoformen  $\iota$  und  $\zeta$  kaum Daten vorliegen. Insbesondere über die PKC $\iota$  gab es bislang keinerlei Informationen über mögliche Funktionen im Herzen.

Die PKC $\iota$  wurde in der Transkriptionsanalyse zwar nicht detektiert, wurde aber schon früher in Herzmuskelzellen nachgewiesen und konnte auf Proteinebene durch Western Blot-Analyse und Immunzytochemie auch in dieser Arbeit detektiert werden. Fehlende Signale in der qPCR wurden daher auf eine sehr geringe Expression zurückgeführt.

Da für die PKC $\iota$  keine spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren erhältlich sind, wurden für diese Untersuchungen Adenoviren konstruiert, um die cDNS des wildtyp-Proteins, einer konsitutiv-aktiven (CA) und einer dominant-negativen (DN) Variante der PKC $\iota$  mit einem c-terminalen GFP in die isolierten Herzmuskelzellen einzubringen. Die Funktionalität der Mutanten wurde in einem Kinaseaktivitätstest verifiziert. Frisch isolierte Zellen wurden mit den Viren infiziert und an Tag 3 die Lokalisation konfokalmikroskopisch analysiert. Die wt-PKC $\iota$  zeigte eine Kolo-kalisation mit dem Z-Scheibenprotein  $\alpha$ -Aktinin, sowie mit F-Aktin. Eine ähnliche Verteilung wurde für die CA-Variante gefunden, die zusätzlich eine Anreicherung

im Zellkern aufwies. Im Gegensatz dazu lokalisierte die DN-Variante hauptsächlich an der Membran und ebenfalls im Zellkern.

Der Einfluss der PKC<sub>1</sub> auf die physiologische Funktion der Herzmuskelzellen wurde mit Hilfe von Kalzium- und Kontraktionsmessungen analysiert. Um zu untersuchen, ob die PKC<sub>1</sub> einen Einfluss auf den Ca<sup>2+</sup>-Haushalt adulter Kardiomyozyten ausübt, wurden Kalziummessungen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2 bei elektrischer Stimulation der Zellen durchgeführt. Frisch isolierte Rattenmyozyten wurden jeweils mit einem der drei PKC<sub>1</sub>-GFP Viren oder einem YFP-Virus zur Kontrolle transduziert. Von den einzelnen Zellen wurde das „Post Rest“-Verhalten, sowie das Verhalten im „Steady State“ hinsichtlich Amplitude, Kalziumbasislinie und Kalziumtransientendauer analysiert. Signifikante Änderungen ergaben sich bei der „Steady State“-Amplitude. Die Expression der konstitutiv-aktiven PKC<sub>1</sub>-Variante führte zu einer signifikant niedrigeren Amplitude der Kalziumtransienten, während die Amplitude der Zellen mit der dominant-negativen Variante deutlich erhöht war. Die Amplituden der Zellen, die die wt-Kinase exprimierten, lag erwartungsgemäß zwischen denen der Mutanten und war gegenüber den Kontrollzellen unverändert. Für alle anderen Parameter wurden keine Änderungen festgestellt.

Nachdem so eine mögliche Funktion der PKC<sub>1</sub> bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung der Kardiomyozyten aufgezeigt werden konnte, wurde in einem anschließenden Experiment analysiert, ob die virusvermittelte Expression der einzelnen PKC<sub>1</sub>-Varianten auch einen Effekt auf die Kontraktion der Muskelzellen hat. Beim Kontraktionsverhalten konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Zellen, die die einzelnen PKC<sub>1</sub>-Varianten exprimierten, ausgemacht werden. Eine Erhöhung/Verringerung der Ca<sup>2+</sup>-Transientenamplitude führte in diesem Fall also nicht gleichzeitig zu einer stärkeren/schwächeren Kontraktion. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Funktion der PKC<sub>1</sub> Herzen.

### **Molecularbiological and physiological analyses of G-protein coupled signalling pathways in adult cardiomyocytes**

G-protein coupled receptor agonists such as endothelin-1, angiotensin-II and phenylephrine activate signalling cascades that induce myocardial hypertrophy. Through modulation of transcription gene expression patterns of chronically stimulated cells are changed and proteins leading to hypertrophy are expressed. In these signalling pathways activated phospholipase C (PLC) hydrolyses the plasma membrane lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to inositol-triphosphate and diacylglycerol. Diacylglycerol in turn activates members of the Protein Kinase C (PKC) family which in turn can activate Protein Kinase D (PKD). Importantly, multiple members of the PKC family have been implicated in the development of cardiac pathologies.

Adult rat ventricular myocytes were isolated, cultured for several days and chronically stimulated with 100 nM endothelin-1 or 100  $\mu$ M phenylephrine. Effects of the hormonal stimulation on gene expression of SERCA, PKC-, PKD- and PLC isozymes were studied by mRNA analysis. For this cells were collected on days 0, 1, 3 and 6 *in vitro* and analysed for transcription of the selected genes by quantitative real-time PCR.

Expression of PLCs  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\delta$ 3,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ 2, PKCs  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\gamma$ , and PKD3 was shown in adult rat cardiac myocytes. Endothelin-1 stimulation led to significant changes in the expression of PLCs  $\beta$ 1,  $\epsilon$  and  $\gamma$ 2, PKCs  $\eta$  und  $\gamma$ , and PKD3 whereas phenylephrine stimulation significantly changed PLC $\beta$ 1 and  $\gamma$ 2, PKCs  $\epsilon$ ,  $\eta$  and  $\gamma$ , PKD3 and SERCA expression. Most changes were detected over cultivation time. For PKC $\gamma$  and SERCA mRNA levels were systematically different from control values. Endothelin-1 treatment led to significantly lower PKC $\gamma$  mRNA expression, while phenylephrine significantly increased PKC $\gamma$  as well as SERCA mRNA expression.

In a second project the effect of atypical PKC $\iota$  on the physiology of adult rat cardiac myocytes was studied. Multiple PKC isoforms are expressed in cardiac

myocytes and participate in contraction, response to extracellular stimuli and promotion of cell growth and survival (Malhotra *et al.*, 2001). While the roles of the conventional and novel PKCs are well characterised, up to now, there was no data available about the putative function of atypical PKC $\epsilon$  in cardiac myocytes.

PKC $\epsilon$  expression was detected in rat cardiac myocytes by western blot and immunocytochemistry. Due to the lack of specific activators or inhibitors for PKC $\epsilon$ , adenoviruses were constructed carrying the cDNA of wildtype (wt) PKC $\epsilon$ , a constitutive-active (CA) and a dominant-negative (DN) PKC $\epsilon$  variant fused to GFP. To test for functionality of the mutant proteins a kinase activity assay was performed. After transduction, the cells expressed the fusion proteins and were used on day 3 for immunocytochemistry and physiological measurements. wt-PKC $\epsilon$  displayed co-localisation with the z-disc protein  $\alpha$ -Actinin and with F-Actin. A similar distribution was found for the CA-mutant which was additionally found in the nucleus whereas the DN-mutant was localised mainly at the plasma membrane and in the nucleus.

Calcium- and sarcomere length measurements were utilised to evaluate the physiological effects of PKC $\epsilon$  in cardiac myocytes. Calcium measurements using Fura-2 showed significant differences in the amplitude of calcium transients in steady state, while there were no differences detectable in the baseline calcium, the transient duration and the post rest amplitude. Expression of CA-PKC $\epsilon$  resulted in significantly lower amplitude whereas the amplitude of cells expressing DN-PKC $\epsilon$  was increased. The amplitude of cells transduced with wt-PKC $\epsilon$  was in between and not different compared to control cells. Using sarcomere length measurements I tested whether PKC $\epsilon$  also affects contractile properties of the myocytes. With these experiments no changes were detected. The increase/decrease in calcium transient amplitude did not simultaneously lead to changes in contraction strength. These results form the basis for further studies of the function of PKC $\epsilon$  in the heart.

## 2. Einleitung

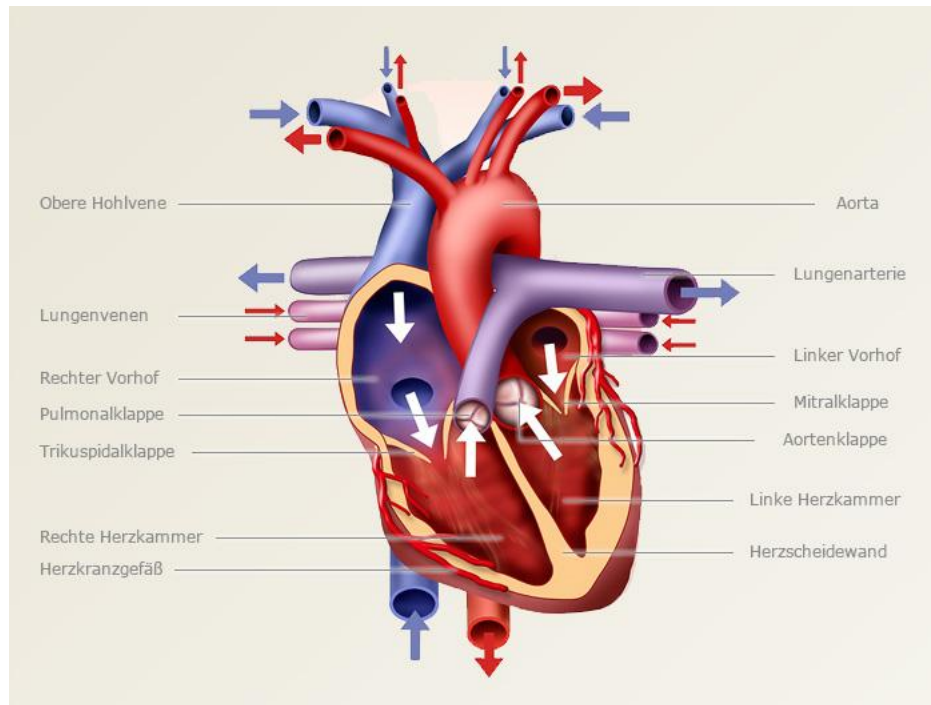
Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems führen die Statistik der Todesursachen in Deutschland mit 41,7 % aller Verstorbenen an (Statistisches Bundesamt, 2010). Um neue Therapieansätze entwickeln zu können, besteht ein enormer Bedarf bei der Aufklärung molekularer Prozesse, die zur Entstehung dieser Krankheitsverläufe führen. Das Verständnis der Abläufe auf zellulärer Ebene und deren Auswirkung auf die Struktur und Funktion des Herzens spielen dabei eine entscheidende Rolle.

### 2.1 Aufbau und Funktion des Herzens

Das Herz ist der Motor unseres Kreislaufs. Es pumpt sauerstoffarmes Blut in die Lunge und sauerstoffreiches Blut in die Organe. Ein bindegewebiger Herzbeutel, das Perikard, grenzt das Herz von den umgebenden Organen ab, beeinflusst seine Form und stabilisiert seine Lage im Thorax. Die Herzwand selbst ist aus mehreren Schichten aufgebaut. Die äußerste Schicht (Epikard) besteht aus Epithelzellen und einer bindegewebigen Schutzhülle, die zugleich die innere Schicht des Perikards bildet. Daran schließt sich der eigentliche Herzmuskel, das Myokard an. Das Myokard besteht aus den Kardiomyozyten, die elektrisch über Gap Junctions miteinander in Verbindung stehen und autorhythmisch aktiv sind. Das Endokard bildet die innerste Schicht der Herzwand und trennt den Herzmuskel vom Hohlraum. Es besteht aus Endothelzellen, die auf einem elastischen Gewebe aufliegen.

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, das durch eine Scheidewand (Septum) in zwei Hälften geteilt wird, die jeweils aus einem Vorhof (Atrium) und einer Hauptkammer (Ventrikel) bestehen. Es verfügt über Ventile in Form von Herzklappen, die sich an den Vorhof-Kammer-Grenzen (Segelklappen), sowie an den Grenzen zwischen den Kammern und den großen Gefäßen (Taschenklappen) befinden (Abbildung 1). Die Herzklappen legen durch ihre Ventilfunktion die Strömungsrichtung des Blutes im Herzen fest und verhindern dadurch einen

Rückfluss von Blut nach der Kontraktion. Gefäße, die das Blut vom Herzen wegführen, werden als Arterien bezeichnet, solche, die dem Herzen Blut zuführen, als Venen.



**Abbildung 1: Innenansicht des Herzens.** Ein sagittaler Querschnitt durch das menschliche Herz zeigt die Unterteilung des Organs in seine vier Kompartimente: linker und rechter Vorhof, sowie linker und rechter Ventrikel. An den Vorhof-Kammer-Grenzen befinden sich die Segelklappen (Trikuspidal- und Mitralklappe), an den Übergängen der Kammern zu den großen Gefäßen die Taschenklappen (Aorten- und Pulmonalklappe). (Quelle: <http://www.transplantation-verstehen.de/dotAsset/25070.jpg>)

Durch Kontraktion des Herzmuskels wird das Blut durch den Körper gepumpt, wodurch es zu allen Organen, Geweben und Zellen gelangt, um diese mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und Stoffwechselprodukte abzutransportieren.

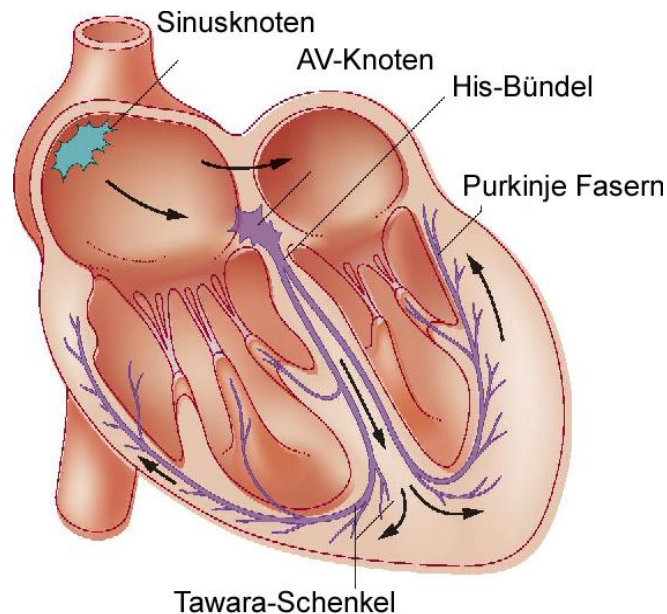


### 2.2 Elektrische Aktivität des Herzens

Im rechten Atrium und in den Ventrikeln werden von spezialisierten Muskelzellen die Strukturen für die Erregungsbildung und Erregungsleitung im Herzen gebildet. Diese Schrittmacherzellen ermöglichen die autorhythmische Kontraktion des Herzmuskels durch Bildung, Koordination und Weiterleitung der Erregung ohne vorangegangene Innervierung durch Motoneurone wie beim Skelettmuskel. Der primäre Schrittmacher des Herzens, der den rhythmischen Herzschlag sicherstellt, ist der Sinusknoten. Er ist am Übergang des rechten Vorhofs zur Vena cava superior lokalisiert und besitzt die höchste Eigenfrequenz. Die von hier ausgehende Erregung wird über die Vorhofmuskulatur weitergeleitet und erreicht den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) auf der rechten Seite des Septum an der Grenze zwischen Atrium und Ventrikel. Die Weiterleitung erfolgt über das His-Bündel, welches die Erregung vom AV-Knoten in die Herzkammern weiterleitet. Es teilt sich in einen rechten und einen linken Schenkel (Tawara-Schenkel), welche sich netzartig verzweigen. Diese Ausläufer (Purkinje Fasern) übertragen die Erregung auf die Ventrikelmuskulatur, wo die Erregung durch die Arbeitsmyozyten selbst weitergeleitet wird (Abbildung 2).

Das Reizleitungssystem unterliegt einer Hierarchie, dem gesamten Myokard wird also die höchste Eigenfrequenz des primären Schrittmachers von etwa 70 Aktionspotentialen pro Minute in Ruhe aufgezwungen. Fällt ein Schrittmacher aus, übernimmt der nachfolgende Teil des Systems seine Funktion mit der ihm eigenen niedrigeren Frequenz.

Die Übertragung elektrischer Signale zwischen benachbarten Myozyten wird durch „Gap Junctions“ ermöglicht. Hierbei handelt es sich um Kanäle, die auf eine interzelluläre Kommunikation spezialisiert sind. Elektrische Impulse werden in Form von Ionenströmen durch die „Gap Junctions“ auf Nachbarzellen übertragen, was die synchrone Kontraktion der Muskelzellen zur Folge hat.



**Abbildung 2: Erregungsleitung im Herzen.** Der natürliche Schrittmacher des Herzens ist der Sinusknoten. Vor jedem Herzschlag sendet er ein elektrisches Signal über den AV-Knoten, das über das His-Bündel und die Tawara-Schenkel an den gesamten Herzmuskel übertragen wird. (Quelle: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>)

### 2.3 Mechanismus der Kontraktion im quergestreiften Muskel

Der Herzmuskel wird zusammen mit den Skelettmuskeln als quergestreifte Muskulatur bezeichnet, da die regelmäßige Struktur der kontraktilen Einheiten zu einem sichtbaren Bandenmuster im Lichtmikroskop führt.

Die kontraktilen Elemente der Muskelzellen werden als Sarkomere bezeichnet. Einzelne Sarkomere sind durch die Z-Scheiben begrenzt. Bei der Muskelkontraktion kommt es zur Verkürzung der Sarkomere, wobei sich die Z-Scheiben aufeinander zu bewegen. Ein Sarkomer besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die an der Kontraktion beteiligt sind. Hauptbestandteile sind die Myofilamente Aktin (dünne Filamente) und Myosin (dicke Filamente), die durch ihre regelmäßige Anordnung für die Querstreifung verantwortlich sind. Dazu kommen Struktur- und Zytoskelettproteine wie zum Beispiel  $\alpha$ -Aktinin und Desmin, welche sich an den Z-Scheiben befinden, und die Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin, die mit Aktin assoziiert sind.

Der aktive Teil bei der Sarkomerverkürzung wird durch das Motorprotein Myosin repräsentiert, welches mit seinem Kopfteil an das Aktinfilament bindet und dadurch eine Querbrücke zwischen beiden Filamenten bildet. Durch Umklappen des Myosin-Kopfes werden die an den Z-Scheiben verankerten Aktinfilamente in Richtung Sarkomermitte gezogen, wodurch die Z-Linien näher zusammen rücken. Die Muskelverkürzung kommt zustande, indem die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbei gleiten. Der Mechanismus der Muskelkontraktion wird daher als Gleitfilamentmechanismus bezeichnet.

Die Aktin-Myosin-Wechselwirkung wird kalziumabhängig von Troponin und Tropomyosin reguliert. Die dünnen Aktinfilamente sind in regelmäßigen Abständen mit einem Komplex aus den drei Troponin-Untereinheiten Troponin C (TnC), Troponin I (TnI) und Troponin T (TnT) besetzt. TnT stellt dabei die Verbindung mit Tropomyosin her, welches als helikal gewundener Doppelstrang spiralförmig um die Aktindoppelhelix verläuft. TnI blockiert die Bindestelle für Myosin und inhibiert dadurch die Bindung von Myosin an Aktin und TnC bindet Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Das Eintreffen eines Aktionspotenzials führt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Dadurch kommt es zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an TnC, welches daraufhin fester an die TnI-Untereinheit bindet. Begleitet durch eine Konformationsänderung im TnT und die dadurch verbundene Verschiebung des Tropomyosins in die Längsrinne der Aktinhelix, gibt TnI seine Bindestelle am Aktin frei, was die Interaktion des Myosinkopfes mit dem Aktinfilament ermöglicht (Bers, 2008).

Bei der Relaxation des Muskels sinkt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , was die Konformationsänderungen des Troponin-Tropomyosin-Komplexes rückgängig macht und zur Hemmung der Interaktion zwischen Myosin und Aktin führt.

### 2.4 Kalzium-Signale in Kardiomyozyten

Kalzium wirkt als ubiquitärer intrazellulärer Botenstoff, der eine Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse in Kardiomyozyten reguliert. Dabei trägt Kalzium im Herzmuskel, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, direkt zur elektrischen

und kontraktile Aktivität bei und ist daher essenzieller Signalstoff bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (EC-Kopplung) (Bers und Guo, 2005).

Durch Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen kann Kalzium zudem indirekt die EC-Kopplung modulieren. Hierbei kann das Genexpressionsmuster in den Herzmuskelzellen verändert werden, was als Erregungs-Transkriptions-Kopplung bezeichnet wird. So können je nach Bedarf verschiedene Signalwege aktiviert werden. Dieser Prozess kann aber auch zu Hypertrophie und Herzversagen führen (Bers und Guo, 2005).

Durch Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien ist die Zelle in der Lage, auf Veränderungen des Energiebedarfs zu reagieren. Es handelt sich dabei um einen langsamen und kumulativen Prozess, der die intra-mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf einen Wert ansteigen lässt, der zur Stimulation bestimmter Dehydrogenasen führt. Dieser ist essenziell zur Anpassung der Energiebereitstellung an den Energiebedarf, da es zu einer gesteigerten Produktion von Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Adenosintriphosphat (ATP) kommt, wodurch ein erhöhter Energiebedarf abgedeckt werden kann (Brandes und Bers, 1997).

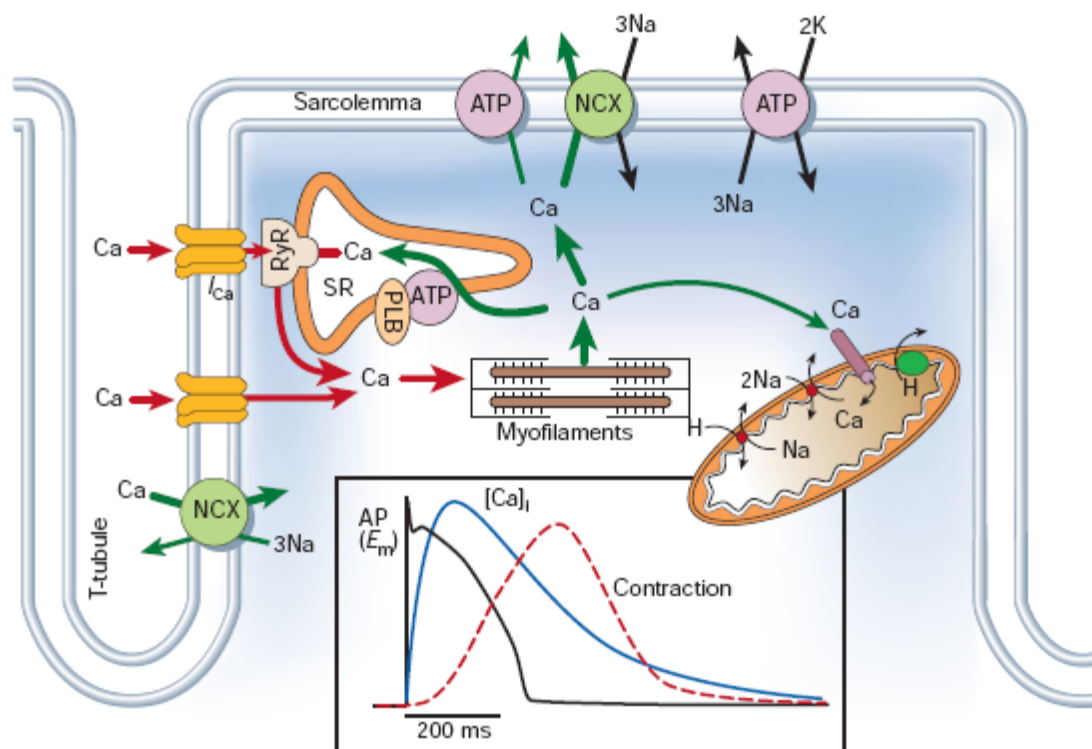
### 2.4.1 Erregungs-Kontraktions-Kopplung

Essenzieller sekundärer Botenstoff bei der EC-Kopplung ist  $\text{Ca}^{2+}$ , da es durch Bindung direkt die Myofilamente aktiviert, die die Kontraktion herbeiführen (Bers, 2002).

Während der Plateauphase des Aktionspotenzials sind die L-Typ Kalziumkanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren - DHPRs) in der Zellmembran geöffnet und es kommt zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zellinnere. Dieser initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Ryanodin-Rezeptoren (RyR) in der SR-Membran (Bers, 2002). Dieser Prozess wird als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release – CICR) bezeichnet.

Die Kombination aus  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung führt zu einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dadurch kann  $\text{Ca}^{2+}$  an TnC in den Myofilamenten binden, was zur Aktivierung des kontraktile Apparates führt (siehe Abschnitt 2.3).

Zur Relaxation ist ein schnelles Absinken der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf den ursprünglichen Wert erforderlich, wodurch es zur Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$  von Troponin C kommt. Der Abtransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol geschieht über vier verschiedene Prozesse, die mit unterschiedlicher Gewichtung zur Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beitragen (Abbildung 3).

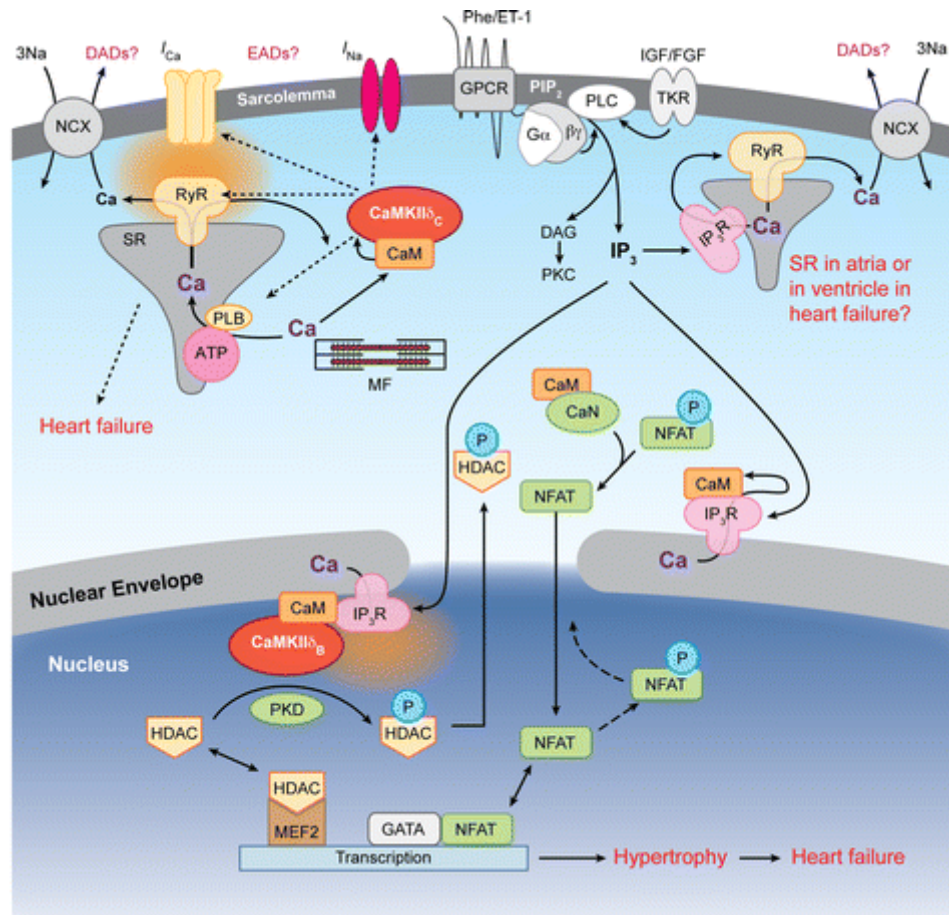


**Abbildung 3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in ventrikulären Myozyten und Zeitverlauf eines Aktionspotenzials.** Nach Depolarisation der Myozytenmembran kommt es zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Die lokal erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führt zur Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren (RyR), welche  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ins Zellinnere entlassen. Durch Binden von  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C wird eine Kontraktion ausgelöst. Die zur Relaxation benötigte Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird hauptsächlich über die SERCA-Pumpe und den NCX erreicht, wobei mit dem mitochondrialen Uniport und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Sarcosommembran noch zwei weitere Systeme zur Verfügung stehen, die  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol abtransportieren. Zudem ist der Zeitverlauf eines Aktionspotenzials, sowie die Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Kontraktion gezeigt. (Bers, 2002)

Die beiden Hauptprozesse, die für die schnelle  $[Ca^{2+}]_i$  Abnahme verantwortlich sind, beinhalten den Transport durch die SR  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA), welche  $Ca^{2+}$  zurück ins SR pumpt und damit den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher wieder auffüllt, und den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX), welcher  $Ca^{2+}$  aus den Muskelzellen in den Extrazellularraum transportiert. Als weitere, allerdings langsamere Systeme zum  $Ca^{2+}$ -Abtransport stehen die  $Ca^{2+}$ -ATPase im Sarkolemma und der mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Uniport zur Verfügung (Bers *et al.*, 1996). Die Prozesse, die die  $Ca^{2+}$ -Konzentration wieder auf das Niveau des Ruhezustandes zurückbringen, werden als „ $Ca^{2+}$ -Removal“-Prozesse bezeichnet.

### 2.4.2 Erregungs-Transkriptions-Kopplung

Als sekundärer Botenstoff ist  $Ca^{2+}$  in der Lage eine Vielzahl verschiedener Proteine zu aktivieren, was zur Modulierung unterschiedlicher Signalwege in der Zelle führt. Durch Aktivierung von Phosphatasen und Kinasen werden  $Ca^{2+}$ -Signale durch An- oder Abschalten verschiedener Signalwege auf vielfältige Art und Weise weitergeleitet, und gelangen so unter anderem auch in den Zellkern.  $Ca^{2+}$  kommt daher auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription zu, was speziell in Kardiomyozyten mit der Entstehung von Hypertrophie im Zusammenhang steht. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von Calmodulin (CaM) Hypertrophie verursacht (Gruver, 1993) während eine Hemmung des Proteins Hypertrophie verhindern kann (McDonough und Glembofski, 1992). Dabei kommen zwei  $Ca^{2+}$ -abhängigen Signalwegen eine bedeutende Rolle bei der hypertrophen Signalübertragung zu: Kalzium - Calmodulin - Calmodulinkinase II - Histondeazetylase ( $Ca^{2+}$  - CaM - CamKII - HDAC) und Kalzium - Calmodulin - Calcineurin - Kernfaktor aktivierter T-Zellen ( $Ca^{2+}$  - CaM - CN - NFAT) (Passier *et al.*, 2000; Molkentin *et al.*, 1998; Zhang und Brown, 2004; Backs und Olson, 2006).



**Abbildung 4:  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der Transkription in Kardiomyozyten.** Zusätzlich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der EC-Kopplung (oben links) und einer potenziellen Rolle der IP3R, Arrhythmien auszulösen (oben rechts), kann durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signaltransduktion zum Zellkern das Genexpressionsmuster durch Modulation der Transkription verändert werden. GPCR und TKR können nach Bindung extrazellulärer Liganden die PLC aktivieren, welche DAG und IP3 produziert. IP3R in der Kernmembran assoziieren mit  $\text{CaMKII}\delta$ , welche durch eine lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aktiviert wird und die HDAC phosphoryliert. Die Phosphorylierung der HDAC führt zum Kernexport des Proteins und beendet dessen unterdrückende Wirkung auf die MEF2-getriebene Transkription. Calcineurin wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin aktiviert und dephosphoryliert daraufhin den Transkriptionsfaktor NFAT. Dieser liegt phosphoryliert im Zytosol vor und transloziert nach Abspaltung der Phosphorylgruppe in den Zellkern. Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor GATA stimuliert NFAT die Transkription von Genen, die zur Entstehung von Hypertrophie führen. Die orange farbenen Wolken markieren die Stellen, wo eine Erhöhung der lokalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  für die Signalübertragung erforderlich ist. (Bers, 2008)

Beide Signalwege können durch extrazelluläre Signale wie zum Beispiel Endothelin-1 (ET-1) oder Phenylephrin (PE) ausgelöst werden. G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), etwa für Endothelin-1 oder  $\alpha$ -adrenerge Agonisten, wie zum Beispiel Phenylephrin- und Tyrosin Kinase Rezeptoren (TKR)

aktivieren nach Bindung ihrer Liganden die Phospholipase C (PLC), was zur Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) führt. Die Bindung von IP<sub>3</sub> an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) in der Kernmembran führt zu einer lokalen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und zur Aktivierung der beiden genannten Signalwege (Bers, 2008) (Abbildung 4).

### **2.5 G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion in Kardiomyozyten und die Entstehung von Hypertrophie**

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören zu den 7-Transmembranrezeptoren. Zu ihnen zählen zum Beispiel die Rezeptoren für die Hormone Endothelin, Angiotensin und Phenylephrin, die alle mit der Entwicklung von Pathologien im Herzen in Zusammenhang stehen.

Neben den monomeren Guanosintriphosphat- (GTP) bindenden Proteinen (G-Proteinen), die die Familie der Ras-Proteine bilden, gibt es die große Klasse der heterotrimeren G-Proteine, die aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bestehen. Die G-Proteine werden nach ihrer  $\alpha$ -Untereinheit klassifiziert, wobei zwischen G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> und G<sub>11</sub> unterschieden wird. Alle G-Proteine haben in inaktivem Zustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Nach Bindung eines extrazellulären Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung auf der intrazellulären Seite des Rezeptors, was zum Austausch von GDP gegen GTP in der  $\alpha$ -Untereinheit und damit zur Aktivierung der G-Proteine führt. Die G $_{\alpha}$ -Untereinheit dissoziiert von der G $_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und es kommt zum Anschalten verschiedener Signalwege.

$\beta$ -adrenerge Agonisten aktivieren den G<sub>s</sub>-gekoppelten Signalweg. Durch Stimulation der Adenylylzyklase kommt es zur Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und anschließender Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) (Molkentin und Dorn II, 2001). Die PKA phosphoryliert Proteine, die an der Kontraktion der Herzmuskelzellen beteiligt sind, wie zum Beispiel L-Typ Kalziumkanäle, Ryanodin-Rezeptoren, Troponin und Phospholamban, was zu einer erhöhten Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten führt (Marian, 2006). Bei



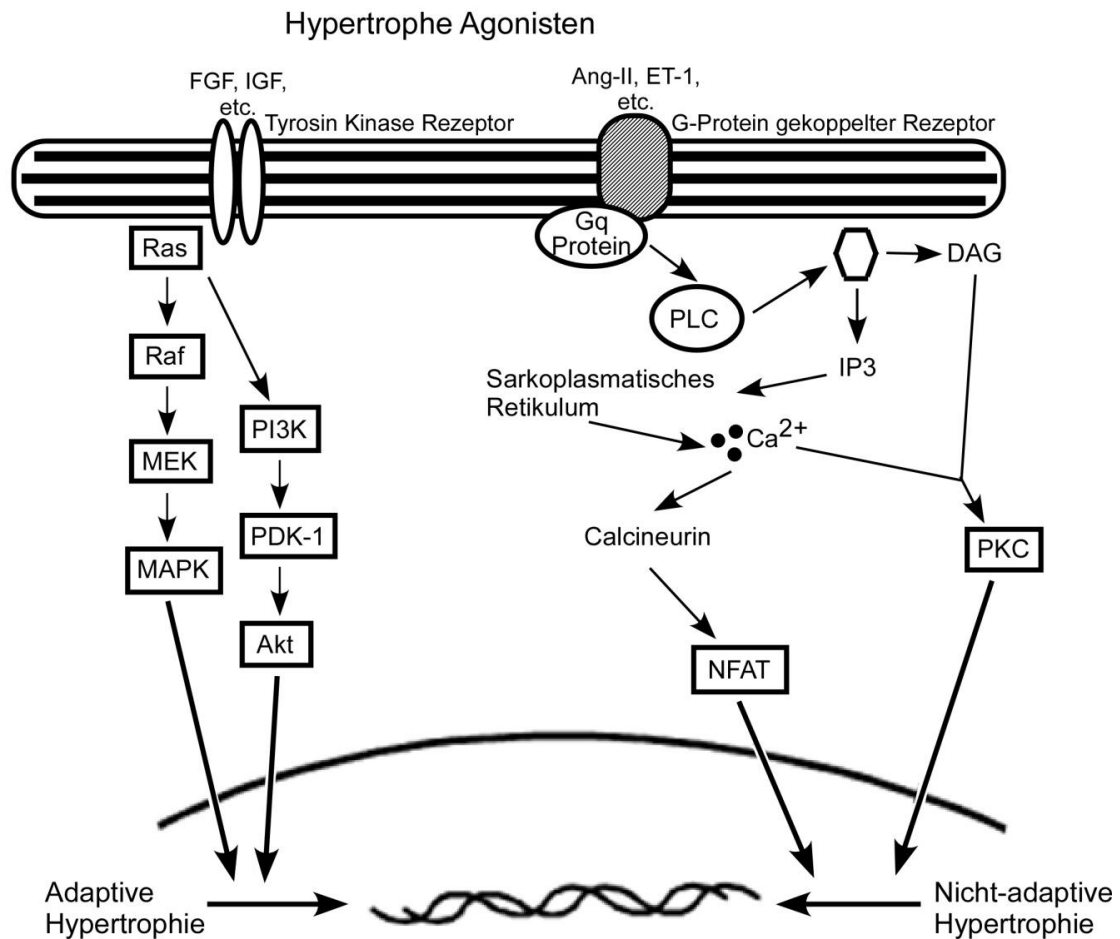
erhöhtem metabolischem Bedarf kommt es so zu einem Anstieg der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft. Langfristig werden durch chronische Überstimulation dieses Signalweges Arrhythmien, Hypertrophie und Herzversagen induziert (Marx *et al.*, 2000; Scoote und Williams, 2004; Woodcock *et al.*, 2007).

Bei der Signaltransduktion über den  $G_q$ -Signalweg ist im Gegensatz dazu die Protein Kinase C (PKC) beteiligt.  $G_{\alpha q}$  führt zur Aktivierung der Phospholipase C  $\beta$ , welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphat (PIP2) zu IP3 und DAG katalysiert. IP3 fördert die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern durch IP3-Rezeptoren, was eine schnelle, transiente Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration zur Folge hat. Eine anhaltende Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  hat die Aktivierung von Calcineurin und NFAT zur Folge (siehe Abbildung 5), welche an der Entstehung der pathologischen, nicht aber der physiologischen Hypertrophie beteiligt sind. DAG verbleibt in der Membran und aktiviert dort einige PKC Isozyme. Die Begriffe der pathologischen und physiologischen Hypertrophie werden nachfolgend erläutert.

Nahezu jeder Rezeptor in der Kardiomyozytenmembran, der an  $G_q$ -Proteine gekoppelt ist, stimuliert die Entstehung von Hypertrophie (Dorn II und Force, 2005). Anhand von Studien an neonatalen ventrikulären Myozyten der Ratte wurde gezeigt, dass tatsächlich die Mehrheit der Hypertrophie auslösenden Stimuli diejenigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktivieren, die das heterotrimere G-Protein  $G_q$  regulieren (Adams und Brown, 2001). Die wichtigsten Vertreter dieses Rezeptortyps stellen die  $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptoren für Norepinephrin und Phenylephrin, der Angiotensin II, sowie der Endothelin-1 Rezeptor dar (Molkentin und Dorn II, 2001).

Kardiale Hypertrophie ist eine adaptive Reaktion des Herzens auf mechanische oder neurohormonale Stimuli. Dabei kommt es zur Vergrößerung der Herzmuskelzellen, zu verstärkter Proteinsynthese, sowie zu Veränderungen in der Sarkomerstruktur. Der Prozess führt zu einer Erhöhung der Arbeitsleistung und einer Verbesserung der Pumpfunktion, was die Anpassung an veränderte physiologische oder pathologische Bedingungen ermöglicht. Dadurch spielt Hypertrophie zunächst eine Rolle als kompensatorische Reaktion, die zum Ziel hat, biomechanischen Stress zu optimieren und die Pumpfunktion zu

normalisieren (kompensatorische Hypertrophie). Chronische hypertrophe Stimulierung kann allerdings zu dilatativer Kardiomyopathie, Arrhythmien, Herzversagen und plötzlichem Herztod führen. Es wird daher zwischen der reversiblen kompensatorischen beziehungsweise der physiologischen Hypertrophie und der irreversiblen pathologischen Hypertrophie unterschieden.



**Abbildung 5: Hypertrophe Signaltransduktion:** Hauptsignalwege, die aufgrund hypertropher Stimuli ausgelöst werden (Rohini *et al.*, 2010).

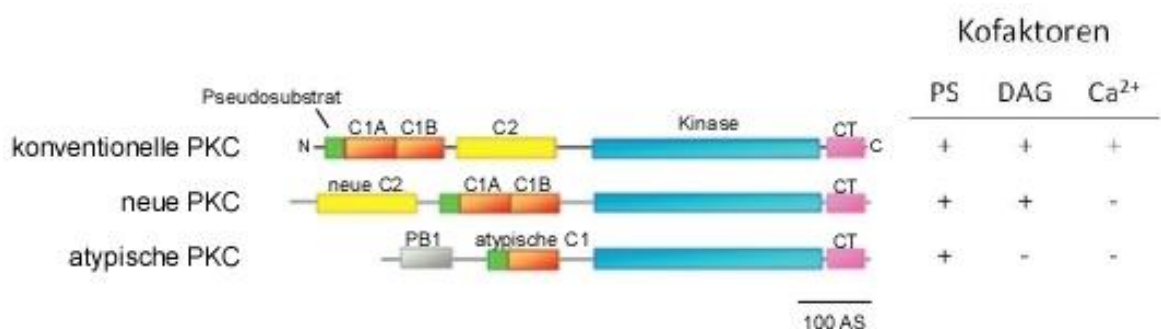
Stark vereinfacht lässt sich sagen, dass bei Entstehung der physiologischen Hypertrophie das Auslösen des Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K) Akt-Signalweges essenziell ist, der durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF), dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) oder

dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) nach Bindung an die entsprechenden Tyrosin Kinase Rezeptoren stimuliert wird. Die Aktivierung der  $G_q/PLC\beta$ -Signalkaskade dagegen spielt vor allem eine Rolle bei der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie, an deren Entstehung auch einige Isozyme der PKC Familie maßgeblich beteiligt sind (Rohini *et al.*, 2010).

## 2.6 Protein Kinase C Familie

Die Protein Kinasen C bilden eine Familie von Serin/Threonin Kinasen, die Signale weiterleiten, die aus rezeptorvermittelter Phospholipidhydrolyse resultieren. Ihnen kommt daher eine enorme Bedeutung in diversen zellulären Funktionen zu und sie spielen außerdem eine Rolle in vielen verschiedenen Pathologien des Herzens (Churchill *et al.*, 2008; Palaniyandi *et al.*, 2009).

Die PKC Familie besteht aus 10 Isozymen, die in 3 Subfamilien eingeteilt werden: Die konventionellen PKCs (cPKCs) ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ), die neuen PKCs (nPKCs) ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) und die atypischen PKCs (aPKCs) ( $\iota$ ,  $\zeta$ ), die sich in ihrer Domänenzusammensetzung und ihren Kofaktoren unterscheiden (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der PKC Subfamilien mit ihrer Domänenzusammensetzung und ihren Kofaktoren.** Die N-terminale Region enthält die regulatorischen Einheiten: Die Membran-„targeting“ Domänen C1A und C1B (orange) und C2 (gelb), Pseudosubstrat (grün) und die Protein-Interaktionsdomäne PB1 (grau). Die Kinase-Domäne (türkis) ist am C-terminalen Ende lokalisiert, woran sich der C-terminale „tail“ (pink) anschließt. Die zur Aktivierung benötigten Kofaktoren sind rechts abgebildet: PS, Phosphatidylserin; DAG, Diacylglycerol; Ca<sup>2+</sup>. (Newton, 2009)

Die einzelnen Mitglieder der PKC Familie werden durch spezifische Mechanismen reguliert, die ihre Struktur, Funktion und subzelluläre Lokalisation bestimmen.

### 2.6.1 Domänenstruktur der PKC

Alle Mitglieder der PKC Familie besitzen eine konservierte Kinasedomäne an ihrem C-terminalen Ende. Der N-terminale Teil besteht aus regulatorischen Elementen, die insbesondere zwei Schlüsselfunktionen besitzen: eine autoinhibitorische Sequenz (Pseudosubstrat) und ein oder zwei Membran-„targeting“ Module (C1- und C2-Domäne). Im Falle der aPKCs kommt noch die Funktion der Protein-Protein-Interaktion, vermittelt durch eine Protein-Interaktionsdomäne (PB1), hinzu.

Aufgrund ihrer Domänenzusammensetzung wird die Aktivität der cPKC Isozyme durch DAG,  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphatidylserin (PS) stimuliert, die der nPKCs durch DAG und PS und die der aPKCs durch PS.

#### 2.6.1.1 Pseudosubstrat

Alle PKCs enthalten in ihrem regulatorischen Teil einen Aminosäureabschnitt, der durch Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms eine Eigenhemmung der Kinase hervorruft (Lipp und Reither, 2011). Diese Pseudosubstratsequenz gleicht einer möglichen Substratsequenz mit der Ausnahme, dass sich an der Phosphoakzeptorstelle anstatt eines Serin- oder Threoninrestes ein Alanin befindet, welches nicht phosphoryliert werden kann. Dadurch passt die Pseudosubstratsequenz sterisch sehr gut ins aktive Zentrum, was die PKC in einen inaktiven Zustand versetzt. Auf dieser Sequenz basierende Peptide sind in der Lage die PKC effektiv kompetitiv zu inhibieren, während Peptide mit einem Serin anstelle des Alanins relativ gute Substrate darstellen (House und Kemp, 1987; Makowske und Rosen, 1989). Die Aktivierung der PKC geht stets mit dem Entlassen des Pseudosubstrats vom aktiven Zentrum einher (Orr *et al.*, 1992; Orr

und Newton, 1994). Die Energie zur Freisetzung des Pseudosubstrates und die daraus resultierende Konformationsänderung wird dabei durch die Bindung der Membran-„targeting“ Module an die Membran bereitgestellt.

### 2.6.1.2 Die Membran-„targeting“ Module C1 und C2

Wie viele weitere Enzyme, die an der zellulären Signalübertragung beteiligt sind, besitzt die PKC Domänen, die die Interaktion mit der Membran ermöglichen und damit für die räumliche Verteilung der Kinase in der Zelle mitverantwortlich sind.

Die C1-Domäne ist eine etwa 50 Aminosäuren lange cysteinreiche Region, die in allen PKCs vorkommt und entweder durch sekundäre Botenstoffe (DAG) reguliert oder davon unabhängig sein kann. Während die c- und nPKCs eine Tandemversion dieser Domäne aufweisen (C1A und C1B), besitzen die aPKCs nur eine einzelne Kopie, die als atypisch bezeichnet wird, da sie nicht in der Lage ist DAG zu binden (Hurley *et al.*, 1997). Aus diesem Grund können die atypischen Isoformen nicht durch Diazylglyzerol aktiviert werden.

Die C1A-DAG Interaktion und die Assoziation mit der Membran führen zu einer Konformationsänderung, die zum Entlassen der Pseudosubstratdomäne aus dem katalytischen Zentrum und damit zur Aktivierung der Kinase führt. Die Aktivierung der aPKCs benötigt ebenfalls die Freisetzung des Pseudosubstrates aus dem aktiven Zentrum der Kinase (Suzuki *et al.*, 2003). Der molekulare Mechanismus, der diesen Aktivierungsprozess reguliert, ist allerdings noch nicht bekannt (Pu *et al.*, 2006).

Wie schon für die C1-Domäne dargelegt wurde, gibt es auch von der C2-Domäne ebenfalls eine durch sekundäre Botenstoffe regulierte und eine davon unabhängige Variante. Die C2-Domäne der cPKCs bindet in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Zellmembran, die das anionische Lipid Phosphatidylserin enthält. Die C2-Domäne der nPKCs bindet dagegen kein  $\text{Ca}^{2+}$  (Johnson *et al.*, 2000). Die aPKCs besitzen keine C2-Domäne und sind daher ebenfalls insensitiv gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ . Durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die C2-Domäne erhöht sich die Affinität der cPKCs für anionische Membranen, die C2-Domäne dient daher als  $\text{Ca}^{2+}$ -

regulierter Membrananker, während die Funktion der „novel“ C2-Domäne, genau wie die der atypischen C1-Domäne noch nicht vollständig geklärt werden konnte (Newton, 2001).

## 2.6.1.3 Katalytische Domäne

Alle PKCs besitzen eine konservierte Kinase-Domäne an ihrem C-Terminus und phosphorylieren Serin- und Threoninreste. In *in vitro* Experimenten wurden mit Hilfe einer Peptidbibliothek die optimalen Substratpeptide für die einzelnen Isoformen ermittelt (Tabelle 1) (Nishikawa *et al.*, 1997).

Typischerweise liegt der zu phosphorylierende Rest in einer basischen Aminosäuresequenz, wobei ein Arginin an Position -3 aufgrund von früheren Studien für alle Isoformen essenziell für die Phosphorylierung zu sein scheint und daher als Voraussetzung in der verwendeten Peptidbibliothek gewählt wurde.

**Tabelle 1: Optimale Peptidsubstratsequenzen der PKC Isozyme.** Die optimalen Sequenzen der einzelnen PKC Isozyme wurden mit Hilfe einer Peptidbibliothek bestimmt und sind im Einbuchstaben-Code dargestellt. Der rote Serinrest stellt die Phosphoakzeptorstelle dar.

	Position												
PKC Isozym	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
PKC $\alpha$	R	R	R	R	R	K	G	S	F	R	R	K	A
PKC $\beta$ I	F	K	L	K	R	K	G	S	F	K	K	F	A
PKC $\beta$ II	Y	K	L	K	R	K	G	S	F	K	K	K	A
PKC $\gamma$	R	R	R	R	R	K	G	S	F	K	R	K	A
PKC $\delta$	A	R	R	K	R	K	G	S	F	F	Y	G	G
PKC $\epsilon$	Y	Y	X	K	R	K	M	S	F	F	E	F	F
PKC $\eta$	A	R	R	R	R	R	R	S	F	R	R	X	R
PKC $\zeta$	R	R	F	K	R	Q	G	S	F	F	Y	F	F

Die optimalen Peptide sind ähnlich, aber nicht identisch mit den Pseudosubstratregionen der einzelnen Enzyme, wobei die Pseudosubstratsequenzen aller PKC Isozyme ebenfalls an Position -3 einen Argininrest enthalten. Alle PKC Isozyme präferieren Peptide mit einer hydrophoben Aminosäure an Position +1 und mit basischen Aminosäuren an den Positionen -6, -4 und -2. PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$  und  $\eta$  bevorzugen Substrate mit basischen Aminosäuren an den Positionen +2, +3 und +4, während die Isozyme  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  hydrophobe Aminosäuren an diesen Regionen selektieren (Nishikawa *et al.*, 1997).

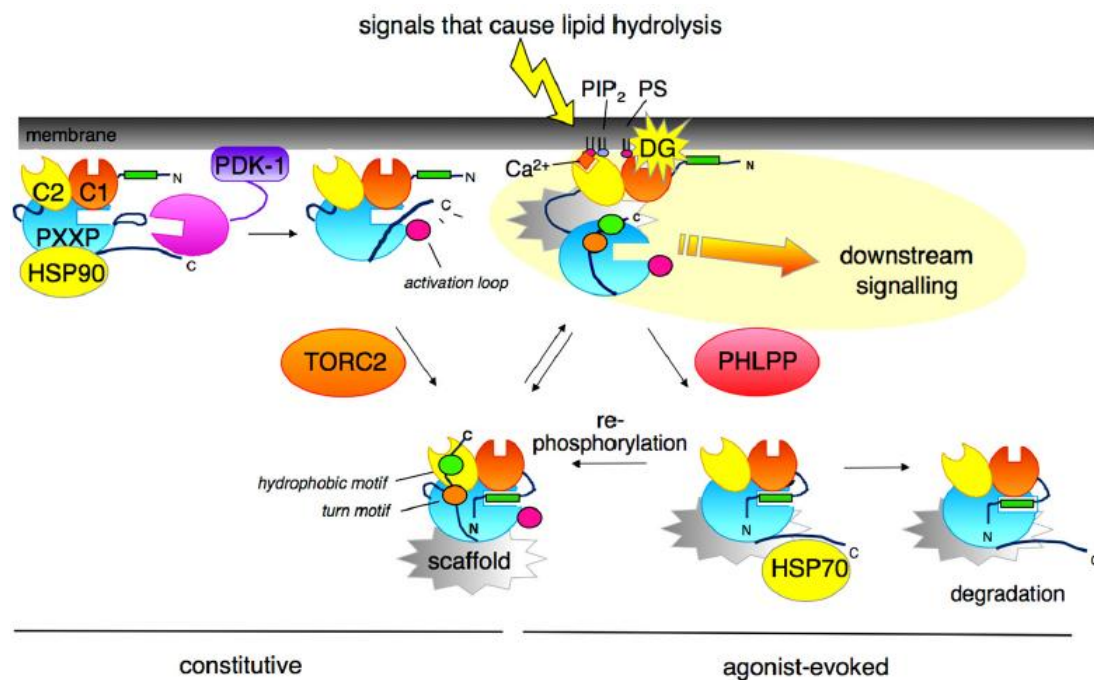
### 2.6.1.4 PB1-Domäne

Als einzige Subfamilie besitzen die aPKCs eine PB1-Domäne (Lipp und Reither, 2011). Es handelt sich hierbei um eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die etwa 80 Aminosäuren umfasst, und die diversen zytoplasmatischen Proteinen unterschiedlicher Signalwege gemein ist (Terasawa *et al.*, 2001). Es wurden zwei Formen der PB1-Domäne beschrieben (Yoshinaga *et al.*, 2003), wobei die Unterscheidung auf dem Vorhandensein eines stark konservierten sauren Motivs basiert, das als OPCA-Motiv bezeichnet wird und das nur bei der Typ I Domäne vorkommt. Durch Bilden von Salzbrücken mit basischen Aminosäuren, insbesondere von Typ II PB1-Domänen, wird durch dieses Motiv eine Heterodimerisierung zwischen den PB1-Domänen zweier Proteine vermittelt. Kontakte zwischen weiteren Bereichen der Domänen tragen zur hohen Affinität und zur Spezifität der modulären Interaktion bei (Sumimoto *et al.*, 2007). Über eine solche Heterodimerisierung kommt es etwa zur Interaktion zwischen den atypischen PKCs und p62 oder Par-6 Proteinen (Moscato und Diaz-Meco, 2000; Wilson *et al.*, 2003).

Zusätzlich zur Dimerisierung können PB1-Domänen außerdem Interaktionen mit anderen Proteindomänen vermitteln, was zu einer großen Anzahl von Interaktionspartnern führt und eine enorme Vielseitigkeit von Interaktionen ermöglicht.

## 2.6.2 Regulation

Protein Kinasen C unterliegen einer akuten strukturellen und räumlichen Regulation. Der Phosphorylierungsstatus, die Konformation, sowie die subzelluläre Lokalisation sind für die physiologische Funktion des Enzyms von enormer Bedeutung.



**Abbildung 7: Modell des PKC Lebenszyklus von der Biosynthese zur Degradation.**

Neu synthetisierte PKC (oben links) assoziiert mit der Membran, wo eine Reihe von Phosphorylierungsreaktionen zur Maturierung des Proteins führen, das so in einen aktivierbaren Zustand versetzt wird. Die maturierte PKC ist im Zytosol lokalisiert, wobei das Pseudosubstrat (grünes Rechteck) die Substratbindestelle besetzt (unten links). Signale, die eine Lipidhydrolyse auslösen, führen zur Rekrutierung der PKC zur Zellmembran, wo es zur Bindung der C1-Domäne an Diacylglycerol (hier: DG) in der Membran kommt. Die Membranbindung löst eine Konformationsänderung aus, die zur Freisetzung des Pseudosubstrates führt und damit ein „Downstream Signalling“ ermöglicht (oben rechts). Diese offene Konformation ist sensitiv für die Dephosphorylierung am hydrophoben Motiv durch die Phosphatase PHLPP, was gefolgt von weiteren Dephosphorylierungen die Degradation des Proteins einleitet (unten rechts). Allerdings ist das Chaperon Hsp70 in der Lage an das dephosphorylierte „Turn Motif“ zu binden. Dieses Ereignis fördert die Rephosphorylierung der PKC, wodurch diese wieder in ihren aktivierbaren Zustand versetzt wird. Spezifische Protein „Scaffolds“ (grau) binden an spezifische Isozyme und spezifische Spezies (aktiv oder inaktive PKC) und halten die PKC an spezifischen zellulären Mikrodomänen. (Newton, 2010)



Die Kinase muss durch Phosphorylierung prozessiert sein, ihr Pseudosubstrat exponieren und korrekt intrazellulär lokalisiert sein, um eine Signalübertragung zu gewährleisten. Sofern eine dieser Voraussetzungen nicht erfüllt ist, wird die Signalübertragung durch die PKC unterbrochen (Newton, 2001).

### 2.6.2.1 Maturierung

Neu synthetisierte PKC Moleküle können zunächst nicht aktiviert werden. Um in einen aktivierbaren, katalytisch kompetenten Zustand zu gelangen, ist eine Phosphorylierung des Proteins notwendig. Die PKC wird hierbei durch drei geregelte Phosphorylierungsreaktionen prozessiert (Keranen *et al.*, 1995).

Dabei ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Phosphorylierung am „Activation Loop“ durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK-1). Hierfür muss die neu synthetisierte PKC an der Membran lokalisiert sein, und dort eine Konformation annehmen, in der das Pseudosubstrat nicht im aktiven Zentrum gebunden ist. In dieser Position wird die Phosphorylierungsstelle am „Activation Loop“ exponiert, was die Phosphorylierung durch die PDK-1 ermöglicht. Die Phosphorylierung am „Activation Loop“ fördert die schnelle Phosphorylierung des „Turn Motif“, einer Prolin-reichen Domäne am C-Terminus. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine Autophosphorylierung (Newton, 2001).

Direkt nach der Phosphorylierung des „Turn Motif“ kommt es zu einer Autophosphorylierung am „Hydrophobic Motif“ der PKC Isozyme. Diese Phosphorylierungsstelle ist die am wenigsten konservierte, wobei die aPKCs hier sogar anstatt eines Serinrestes einen Glutamatrest enthalten, der durch die negative Ladung eine Phosphatgruppe initiiert (Keranen *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung an dieser Position beeinflusst zwar die subzelluläre Lokalisation und Stabilität der PKC, ist aber genau wie die Phosphorylierung am „Activation Loop“ nach vollständiger Maturierung der PKC nicht mehr notwendig für deren Kinaseaktivität (Keranen, 1995; Edwards und Newton, 1997; Bornancin und Parker, 1997). Einzig die negative Ladung am „Turn Motif“ ist essenziell für die Funktion der maturierten PKC (Keranen, 1995).

### 2.6.2.2 Allosterische Regulation durch Membranbindung

Generelles Merkmal der PKC Aktivierung innerhalb der Zelle ist die Translokation des Proteins zur Plasmamembran oder anderen zellulären Membranen. Dabei spielt die Anwesenheit von Diazylglyzerol in der Membran eine große Rolle, da die Affinität der PKC für Membranen dadurch enorm erhöht wird. Diazylglyzerol wird in der Zelle schnell metabolisiert, was die Membranrekrutierung und Aktivierung der PKC durch DAG kurzlebig macht (Newton, 2001). Wie der Prozess der Membrantranslokation bei den atypischen Isoformen reguliert wird, ist nicht geklärt, da diese Isoformen nicht durch DAG aktiviert werden können.

Als einzige Unterfamilie werden die cPKCs zusätzlich von  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, welches an die C2-Domäne bindet und eine vorläufige Translokation zur Membran bewirkt, wo es zur Interaktion der C1-Domäne mit DAG kommt. Diese Interaktion wird durch die stereospezifische Bindung an Phosphatidylserin verstärkt (Newton, 2001).

Die Aktivität aller PKC Isozyme wird durch PS reguliert, welches ausschließlich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran eingebaut wird. Die Sensitivität der PKCs für PS wird durch die C1B-Domäne vermittelt (Lipp und Reither, 2011). Obwohl die atypische Variante dieser Domäne kein DAG bindet, ist die Affinität für PS vorhanden. Die Mechanismen der Kofaktorbindung und Membranrekrutierung der cPKCs und der nPKCs wurden ausgiebig analysiert (Newton, 2010), während die Regulation der aPKCs nicht genauer untersucht wurde und noch unklar ist.

### 2.6.2.3 Räumliche Regulation durch Ankerproteine

Die biologische Funktion der PKC ist abhängig von ihrer korrekten räumlichen Verteilung. Diese Lokalisation wird durch verschiedene Bindungspartner vermittelt, die als Anker- oder Gerüstproteine für die PKC dienen. Sie positionieren die PKC Isozyme damit nahe ihren Substraten, in der Nähe von Regulatoren wie Phosphatasen und Kinasen oder in spezifischen subzellulären Kompartimenten (Mochly-Rosen, 1995; Jaken und Parker, 2000). Einige Ankerproteine können

mehrere Isozyme binden, während andere spezifisch die Verteilung einzelner Isozyme kontrollieren. Die Bindung zwischen beiden Proteinen geschieht dabei nicht wie bei der PKA über nur einen einzelnen bestimmten Mechanismus. Je nach Bindungspartner existieren Interaktionsstellen in den regulatorischen Regionen, sowie in der katalytischen Domäne. Es existieren Bindeproteine für alle möglichen Konformationen und Spezies der PKC. Einige binden die PKC im unphosphorylierten Zustand (Takahashi *et al.*, 2000), andere im phosphorylierten aber inaktiven Zustand (Klauck *et al.*, 1996) und wieder andere im phosphorylierten und aktiven Zustand (Mochly-Rosen *et al.*, 1991). Die Familie der Rezeptoren für aktivierte C Kinasen (RACKs) interagieren zum Beispiel mit der aktivierten Spezies und beeinflussen damit nicht nur die Lokalisation der PKC, sondern stabilisieren durch die Bindung auch die aktive Konformation der Kinase. Dadurch kann auch in Abwesenheit von Kofaktoren eine Signalübertragung durch die PKC weiter erfolgen (Newton, 2010). Die Entdeckung bestimmter Aminosäureabschnitte in den RACKs, die mit ähnlichen Bereichen innerhalb der PKC Moleküle konkurrieren und dadurch eine Eigenhemmung aufheben, führte zur Entwicklung von Peptiden, die die Interaktion zwischen den PKCs und ihren RACKs blockieren können (Churchill, 2009; Newton, 2010). Solche Peptide zeigten sich besonders nützlich in der Regulation der Aktivität von PKC Isozymen bei Herzkrankheiten (Palaniyandi *et al.*, 2009).

Ankerproteine können sowohl eine positive, als auch eine negative Regulation der Signalübertragung (Tabuse *et al.*, 1998 bzw Diaz-Meco *et al.*, 1996) bewirken. Protein-Protein-Interaktionen spielen damit eine Schlüsselrolle in der Regulation von Signalkaskaden rund um die PKC.

### 2.6.3 PKCs im Herzen

Die Expression einzelner PKC Isozyme im Herzen wurde sowohl auf „messenger“ RNS (mRNS)-Ebene, als auch auf Proteinebene ausgiebig untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass sich das Expressionsmuster zwischen verschiedenen Spezies unterscheidet und die Ergebnisse aus Tierversuchsstudien daher nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind.

In adulten ventrikulären Myozyten der Ratte konnte die Expression der Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\iota$  und  $\zeta$  gezeigt werden (Hudman und Standen, 2004). Im adulten humanen Herzen wurden die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\iota$  und  $\zeta$  nachgewiesen (Simonis *et al.*, 2007).

In der gesunden Herzmuskelzelle sind die PKCs an der Muskelkontraktion, der Reaktion der Muskelzellen auf extrazelluläre Stimuli, sowie an Zellwachstum und -überleben beteiligt (Malhotra *et al.*, 2001). Dabei sind die Funktionen der cPKCs und der nPKCs sehr gut untersucht, wohingegen für die atypischen Isoformen  $\iota$  und  $\zeta$  kaum Daten vorliegen.

Diverse Studien haben gezeigt, dass ausgewählte PKC Isozyme sowohl an chronischen kardialen Erkrankungen, als auch an der Entstehung von Hypertrophie und Herzversagen beteiligt sind (Palaniyandi *et al.*, 2009). Diese Erkenntnisse basieren auf Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten, transgenen Mäusen, die einzelne PKC Isozyme heterolog exprimieren, PKC Knock-out- (KO) Mäusen, Rattenmodellen und der Verwendung Isoform-selektiver Agonist- beziehungsweise Antagonist-Peptide.

In unterschiedlichen Studien wurde gezeigt, dass die Isozyme  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\varepsilon$  in neonatalen kultivierten Kardiomyozyten Hypertrophie fördern (Vijayan *et al.*, 2004; Kerkela *et al.*, 2002; Vallentin und Mochly-Rosen, 2007; Sil *et al.*, 1998). In zwei verschiedenen Rattenmodellen mit Herzversagen konnte gezeigt werden, dass die Expression der PKC $\alpha$  im frühen Stadium unverändert, im Endstadium der Krankheit jedoch erhöht ist (Belin *et al.*, 2007). Herzen von Mäusen mit myokardialem PKC $\alpha$ -KO weisen erhöhte Kontraktionsleistungen auf, während eine heterologe Expression der PKC $\alpha$  zu Hypokontraktilität führt (Braz *et al.*, 2004). Das Expressionsniveau der PKC $\beta$  in Ratten mit Hypertonie-induziertem Herzversagen ist normal im Stadium der Hypertrophie, steigt aber im weiteren Verlauf beim Übergang zum Herzversagen deutlich an (Inagaki *et al.*, 2002). Die Rolle der PKC $\beta$  bei der Entstehung von Hypertrophie bei Mäusen ergab bislang widersprüchliche Ergebnisse, wobei eine erhöhte Expression der PKC $\beta$  Hypertrophie zu fördern scheint (Wakasaki *et al.*, 1997; Bowman *et al.*, 1997), ein Knock-out des Proteins Hypertrophie allerdings nicht verhindern kann (Roman *et*

*et al.*, 2001). Eine Aktivierung der PKC $\epsilon$  in Ratten mit Hypertonie fördert Fibrose und Herzversagen, während eine Inhibition des Proteins die Überlebensdauer verlängert, Hypertrophie, sowie Fibrose, vaskuläre Remodellierung und Inflammation reduziert und die kardiale Fehlfunktion korrigiert (Inagaki *et al.*, 2008; Palaniyandi *et al.*, 2008). In humanen Proben von Patienten mit Herzversagen wurden erhöhte PKC $\beta$ -Expressionsraten, sowie eine gesteigerte Aktivität dieser Isoform festgestellt (Bowling *et al.*, 1999; Simonis *et al.*, 2007).

Einige Isozyme der PKC Familie sind auch an der Entstehung von Fibrose im Herzen beteiligt. Dabei spielen die Isozyme  $\delta$  und  $\zeta$  eine Rolle bei der basalen Fibroblastenproliferation (Braun und Mochly-Rosen, 2003), während die PKC $\epsilon$  eine wichtige Rolle bei der Regulation der Adhäsion und Migration von Fibroblasten spielt (Stawowy *et al.*, 2005). In Ratten wurde durch Inhibition der cPKCs die pathologische Fibrose nach einem Infarkt abgeschwächt und die Herzfunktion verbessert, was eine Rolle dieser Subklasse bei der Entstehung von Fibrose im Herzen vermuten lässt (Boyle *et al.*, 2005).

Diverse Untersuchungen zeigen auch die Rolle der PKCs bei der Produktion und Freisetzung pro-inflammatorischer Substanzen auf (Shapira *et al.*, 1997; West *et al.*, 1997; Devaraj *et al.*, 2005). So scheint zum Beispiel die Tumornekrosefaktor- $\alpha$  induzierte Apoptose über eine Beteiligung der PKC zustande zu kommen. Auf unterschiedliche Isoformen wurde hier allerdings nicht eingegangen (Li *et al.*, 1999).

Eine Zusammenfassung der in einer Vielzahl von Untersuchungen verwendeten Modelle mit ihren Phänotypen und der damit in Zusammenhang gebrachten PKC Isozyme gibt Palaniyandi *et al.* (2009).

Wie bereits dargelegt, regulieren PKC Isozyme eine Vielzahl von Vorgängen im Herzen, die mit diversen Pathologien in Zusammenhang stehen. PKCs werden daher schon lange als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von kardialen Erkrankungen in Erwägung gezogen. Die Schwierigkeit dabei liegt in der ubiquitären Expression der PKCs und den zahlreichen normalen physiologischen Funktionen, an denen die einzelnen Isoformen beteiligt sind. Regulatoren für bestimmte Isozyme müssen zudem hoch spezifisch sein, was bei der zum Teil

enormen Homologie zwischen einzelnen Isozymen eine große Herausforderung darstellt. Zudem kann es zwischen verschiedenen Isozymen der gleichen Unterfamilie zu kompensatorischen Effekten kommen.

### 2.7 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll zwei unterschiedliche Fragestellungen beantworten. Eine mRNA Transkriptionsanalyse mit kultivierten Herzmuskelzellen, die mit Endothelin-1 oder Phenylephrin stimuliert werden, soll Aufschluss auf mögliche Veränderungen in der Transkription von PKC-, PKD- und PLC-Isozymen geben. Diese Proteine sind an der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung beteiligt, welche durch das Binden der beiden Hormone an ihre entsprechenden Rezeptoren ausgelöst wird. Da eine chronische Stimulation auch Veränderungen in der Genexpression auslöst, soll untersucht werden, ob die hierfür benötigten Proteine durch diesen Signalweg auch auf Transkriptionsebene reguliert werden und somit Einfluss auf die zelluläre Antwort nehmen.

Ein zweites Projekt hat die Untersuchung der atypischen PKC<sub>1</sub> in adulten Kardiomyozyten zum Fokus. Für diese Studie sollen Viren konstruiert werden, die die „copy“-DNS (cDNS) der PKC<sub>1</sub> enthalten. Zur Verfolgung der Expression *in vivo* wird C-terminal die cDNS für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) an die PKC<sub>1</sub> fusioniert. Ziel ist es, Viren für das wt-Protein, sowie für eine konstitutiv-aktive und eine dominant-negative Variante herzustellen. Damit soll die Lokalisation des Proteins in den Kardiomyozyten in Abhängigkeit seiner Aktivität untersucht werden. Zusätzlich soll der Einfluss der PKC<sub>1</sub> auf den Kalziumhaushalt der Herzmuskelzellen, sowie auf die Sarkomerlängen bei der Kontraktion untersucht werden, um so festzustellen, ob die PKC<sub>1</sub> einen Effekt auf die Erregungs-Kontraktionsbeziehung adulter Kardiomyozyten ausübt.

## 3. Material & Methoden

### 3.1 Chemikalien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Fluka, Buchs, CH
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-bis 40 %	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose Typ VII für Zellkultur	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumperoxisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Seelze
Ampizillin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Borsäure	ICN Biomedicals, Frankfurt a.M.
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Cäsiumchlorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Seelze
Chloramphenikol (Cm)	Fluka, Buchs, CH
Coomassie Brilliantblau G-250	Fluka, Buchs, CH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Seelze
DNase	Sigma-Aldrich, Seelze
dNTPs	Roth, Karlsruhe
Endothelin-1	Sigma-Aldrich, Seelze
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, CH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Fluka, Buchs, CH
Extrazelluläre Matrix (EZM) Gel	Sigma-Aldrich, Seelze
Fötales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Fura-2 AM	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich, Seelze

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Fluka, Buchs, CH
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Seelze
LE Agarose für Gelelektrophorese	Biozym, Hessisch Oldendorf
Liberase	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Nano Juice Transfektionsreagenz	Novagen, Madison, WI, USA
Natrium-ATP (Na-ATP)	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumzitat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biomedicals, Frankfurt a.M.
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Seelze
Paraformaldehyd (PFA)	Riedel-de Haen, Seelze
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrine	Sigma-Aldrich, Seelze
Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85 %	Roth, Karlsruhe
Pluronic F-127	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Roti <sup>®</sup> -Mark Western Set	Roth, Karlsruhe
ROX	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 32 %	Merck, Darmstadt
SYBR Green I	Invitrogen, Karlsruhe
Tetramethyl-Ethylendiamin (Temed)	Merck, Darmstadt
Tetrazyklin (Tc)	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Transferrin	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Promega, Mannheim
Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trizma <sup>®</sup> Base	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin EDTA	PAA Laboratories, Pasching, AU
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich, Seelze
Xylenzyanol	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe



### 3.2 Messsysteme

- Leica TCS SP5 II Konfokalmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Video Imaging System (TILL Photonics GmbH, Gräfeling, Deutschland)
- Zell-/Sarkomerlängenmesssystem (IonOptix Corp., Milton, USA)

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquelle**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
0,2 ml Reaktionsgefäße 8er Streifen	Biozym, Hessisch Oldendorf
0,2 ml Reaktionsgefäße	Star Lab, Ahrensburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Probenröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
20 ml Spritzen	B. Braun, Melsungen
50 ml Probenröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
96 Loch Mikrotiterplatten	Biozym, Hessisch Oldendorf
Amicon Ultra-15 Säulen	Millipore, Schwalbach
Deckgläser	VWR, Darmstadt
Einweg Küvetten	Roth, Karlsruhe
Einwegpipetten 5, 10, 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterpapier	GE Healthcare, München
NAP25-Säule	GE Healthcare, München
Objektträger	VWR, Darmstadt
P81-Papier	GE Healthcare, München
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Star Lab, Ahrensburg
Pipettenspitzen gestopft	Star Lab, Ahrensburg
Roti Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Roth, Karlsruhe
Sechsllochplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm	GE Healthcare, München

Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	GE Healthcare, München
Zentrifugenröhrchen für SW41 Rotor	Beckmann Coulter, Krefeld
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm)	Nunc, Langenselbold
Zwölflochplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 3.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen**

Name der Lösung	Zusammensetzung
10x DNS Ladepuffer	40 % (w/v) Harnstoff, 40 % (w/v) Glycerol, 50 mM EDTA (pH 8), 10 mM Tris-HCl (pH 7), 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol
10x Platinum Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>
Adenovirus-Lagerungspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 % (v/v) Glyzerin, autoklaviert
6x Protein Ladepuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glyzerin, 30 % (w/v) SDS, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 50 µl/ml β-Mercaptoethanol
Blockierpuffer	10 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
Bradford Reagenz	50 mg Coomassie-Brilliantblau G-250 in 10 ml Ethanol absolut, 175 ml o-Phosphorsäure (85 %), mit Aqua dest. auf 825 ml auffüllen
Zitrat Lösung	117,64 mg Natriumzitrat in 10 ml 0,9 % (w/v) NaCl Lösung
DNase Lösung	Deoxyribonuclease I, Typ 2 aus Rinderpankreas, 15 mg in 5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,35), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT Zu dieser Lösung 1 Volumen Glyzerin
Extrazelluläre Matrix (EZM)	1 ml der gekauften Stocklösung (ECM-Gel, Sigma)

Lösung	in 6 ml Medium M199
Insulin-Transferrin-Selenit (ITS) Lösung	25 mg Insulin, 25 mg Transferrin, 25 mg Natriumselenit in 5 ml Aqua dest., pH mit wenigen Tropfen HCl einstellen, bis die Flüssigkeit klar wird
Kinase Assay Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EGTA, 10 mM Magnesiumacetat
Liberase Lösung	500 µl Stocklösung in 15 ml Lösung A
Liberase Stammlösung	10 mg/ml Liberase Blendzym 4 in Aqua dest.
Lösung A	134 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM Glukose, 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> , 1,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM HEPES, pH 7,3
Lösung A+	Lösung A, 0,2 mM EGTA, pH 7,3
Lösung B	Lösung A, 200 µM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % (v/v) DNase Lösung
Lösung B1/2	Gleiche Teile Lösung A und Lösung B
Narkoselösung	Mischung aus 1 ml Ursotamin (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid) und 240 µl Rompun (2 % Xylazinhydrochlorid)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1 Tablette in 200 ml Aqua dest. entspricht: 10 mM Phosphatpuffer, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4
PBST	PBS, 0,1 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20
PKC Extraktionspuffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,05 % (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100, 10 mM β-Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor Cocktail
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS
SDS Laufpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 10 g/l SDS,
Strip Puffer	PBST, 0,01 % (w/v) Natriumazid
Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 20 % (v/v) Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Laufpuffer	50 mM Tris, 50 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA, pH 8,3

Tyrode	135 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> , 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH 7,35
--------	--

### 3.5 Nährmedien für Zell- und Bakterienkultur

**Tabelle 5: Verwendete Nährmedien für Bakterienkulturen**

Name des Mediums	Zusammensetzung
LB Medium flüssig	10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7
LB Medium fest	10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar, pH 7
NZY <sup>+</sup> Medium	10 g/l Casein Hydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5 Nach Autoklavieren zufügen: 12,5 ml/l 1 M MgCl <sub>2</sub> , 12,5 ml/l MgSO <sub>4</sub> , 10 ml/l 2 M Glukose (jeweils vorher steril filtriert)

**Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien**

Medium	Zusätze	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	4,5 g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199	L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, AU

### 3.6 Isolation und Kultivierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte

Die Isolation und Kultivierung adulter Kardiomyozyten der Ratte erfolgte wie zuvor beschrieben (Viero *et al.*, 2008) mit geringfügigen Änderungen.

### 3.6.1 Zellisolation

6 bis 12 Wochen alte, männliche Wistar Ratten (Charles River) wurden durch intraperitoneale Injektion mit 170 µl Narkoselösung (Ursotamin/Rompun) pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Die zusätzliche Injektion von Zitratlösung (2 µg/g Körpergewicht) verhinderte eine Koagulation des Blutes. Nach Töten des Tieres durch Dekapitation und Entfernen des Perikards wurden 5 ml eiskalte Lösung A+ in beide Ventrikel injiziert, was dem Auswaschen von Blut aus dem Herzen diente. Die Aorta wurde anschließend durchtrennt und das Herz an einer Langendorff Perfusionsapparatur aufgehängt. Nach einer 10 minütigen retrograden Perfusion mit Lösung A+ (Raumtemperatur) erfolgte die Umstellung auf die Liberaselösung (37 °C) für etwa 25 Minuten. Je nach Größe des Herzes war es wichtig, die Zeit für den Liberaseverdau individuell anzupassen. Nach dem Abnehmen des Herzes von der Apparatur, wurden in einer Schale mit Lösung A die Atrien sowie die Gefäße entfernt und die Ventrikel in 5 bis 6 Stücke geschnitten. Das Waschen der Stücke erfolgte zwei Mal in 20 ml Lösung A und 2 Mal in 20 ml Lösung B1/2 bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Beim anschließenden Triturieren der Gewebestücke in Lösung B1/2 mit einer abgeschnittenen Plastik-Pasteurpipette, zerfiel das Gewebe in einzelne Zellen. Der Überstand, der die Herzmuskelzellen enthielt, wurde abgeschüttet und mit Lösung B auf die gewünschte Zelldichte verdünnt.

### 3.6.2 Kultivierung

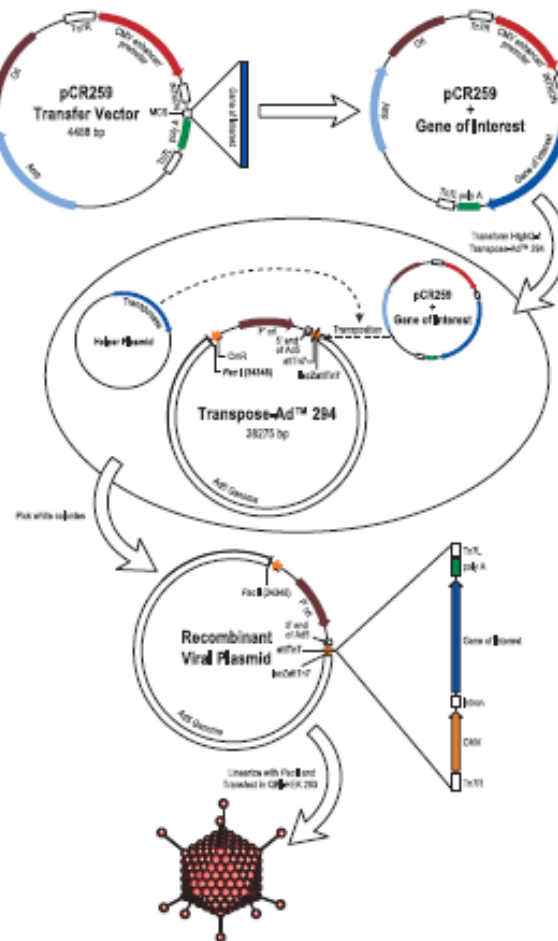
Sterile Deckgläser (20 mm Durchmesser) wurden in 12-Well Platten gegeben und mit 20 µl EZM Lösung gleichmäßig beschichtet. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur, wobei die Lagerung vorbeschichteter Platten über Nacht im Kühlschrank möglich war. Pro Well wurde 1 ml Medium M199 (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml Kanamycin und ITS Lösung im Verhältnis 1:1000) vorgelegt. Die Zugabe von 250 µl bis 350 µl Zellsuspension ins Medium erfolgte mit einer abgeschnittenen 1000 µl-Pipettenspitze. Die Kultivierung fand bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) im Inkubator statt. Ein Mediumwechsel nach einer Stunde diente zum Entfernen nicht haftender und toter Zellen. Direkt im

Anschluss standen die Zellen für Versuche zu Verfügung, konnten durch Zugabe von Hormonen stimuliert oder durch Viruszugabe transduziert werden. An den Tagen 1 und 3 nach Isolation wurde das Medium abgenommen und durch frisches ersetzt.

### 3.7 Herstellung von Adenovirusvektoren

Wie zuvor in Viero *et al.* (2008) und Hammer *et al.* (2010) beschrieben, wurde zur Herstellung rekombinanter Adenoviren das Transpose-Ad™ Vektor System, ein Transposon 7 basiertes Transpositionssystem, von QBiogene nach Herstellerprotokoll verwendet. Die gewünschten Fusionsproteine aus PKC und Fluoreszenzprotein wurden wie in Abschnitt 3.8.8 beschrieben in den Transfervektor pCR259 (Amp-Resistenz) kloniert und in HighQ-1 Transpose-Ad™ 294 kompetente Zellen transformiert. Diese Zellen enthalten den Virusvektor Transpose-Ad™ 294 (Cm-Resistenz), sowie ein Helferplasmid (Tc-Resistenz), das für eine Transposase kodiert. Die Transposase führt die Transposition des Fusionsproteins aus dem pCR259 Vektor in den Transpose-Ad™ 294 Vektor durch. Dadurch entsteht der fertige Adenovirusvektor, der das gewünschte Protein unter der Kontrolle eines Cytomegalie-Virus- (CMV) Promotors enthält. Die Insertionsstelle liegt dabei im  $\beta$ -Galaktosidase-Gen, wodurch positive Klone durch eine Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden können. Die Transformation wurde mindestens drei Stunden bei 37 °C geschüttelt, um der Transposase genügend Zeit zu geben, die Reaktion durchzuführen. Die aus weißen Kolonien präparierte Plasmid-DNS enthielt eine Mischung aus allen 3 Plasmiden, wobei jedes der Plasmide eine eigene Antibiotika-Resistenz besitzt. Um den Virusvektor zu isolieren, wurden 50 ng der Plasmidmischung in DH5 $\alpha$ -Bakterien transformiert und auf Chloramphenicol ausplattiert. Die darauf gewachsenen Plasmide enthielten in der Regel nur noch den Virusvektor, was durch Überstreichen auf Ampizillin- und Tetrazyklin-Platten überprüft wurde. Nur Klone, die auf keiner der beiden Antibiotika gewachsen waren, waren für eine erneute Plasmidpräparation geeignet.

Um eine ausreichende Menge Plasmid-DNS zur Virusherstellung zu erhalten, erfolgte die Anzucht der mit dem Plasmid transformierten Bakterien in einer 600 ml Flüssigkultur in LB Medium. Dieses Volumen war notwendig, da es sich bei dem Virusvektor um ein „single-copy“ Plasmid handelt.



**Abbildung 8: Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem Transpose-Ad™ System.** Der Eingangsvektor, der das gewünschte Gen enthält, wird in HighQ-1™ chemisch kompetente Zellen transformiert. Diese enthalten neben dem Transpose-Ad™ 294 Virusvektor noch ein Helferplasmid. Die vom Helferplasmid kodierte Transposase führt die Transposition des gewünschten Gens in den Virusvektor durch. Dieser wird isoliert und mit PacI linearisiert. Nach Transfektion in eine Verpackungszelllinie werden Viruspartikel produziert. (nach Applications Manual Transpose-Ad™ Adenoviral Vector System)

5 µg Virusvektor-DNS wurden eine Stunde mit PacI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) linearisiert und der 50 µl Ansatz anschließend im Vakuumkonzentrator auf etwa 10 µl eingeengt. Am Tag zuvor in 6-Well Platten ausgesäte 293A HEK Zellen wurden mit 5 µg DNS mit 5 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert.

Nach Transfektion von 293A HEK Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem Transpose-Ad™ 294 Plasmid beginnen diese Viren herzustellen. Diese Verpackungs-Zelllinie enthält die E1A und E1B Ad5 viralen Gene, die dem rekombinanten Adenovirus fehlen. Die Deletion dieser essenziellen Gene führt dazu, dass die Viren zwar Zellen infizieren können, aber nicht in der Lage sind, sich zu replizieren. Die Bereitstellung dieser Gene durch die 293A HEK Zellen komplementiert die Deletion, was die Replikation der Viren in dieser Zelllinie ermöglicht.

An Tag 2 nach Transfektion war es notwendig die Zellen auf eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) zu expandieren. Um keine Partikel zu verlieren, wurde das Medium abgenommen und komplett in die Flasche überführt. Die Zellen wurden ohne Waschen trypsinisiert, in frischem DMEM resuspendiert und in die Flasche gegeben. Wenn an mehreren Stellen deutliche zytopathische Effekte zu erkennen waren (in der Regel nach ein bis zwei Wochen), erfolgte das Ernten der Zellen durch einfaches Abspülen. Der Zellaufschluss passierte durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und Auftauen bei 37 °C. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 8000 x g abzentrifugiert und der Überstand durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert. Die Lagerung der Viren erfolgte bei -80 °C.

Aus diesem Virusstock konnten jederzeit durch Infektion von 293A HEK Zellen neue Viren hergestellt werden (Amplifikation).

### 3.7.1 Virusamplifikation

Zur Amplifikation wurden die bei -80 °C gelagerten Viren bei Raumtemperatur aufgetaut und zum Medium von etwa 50 % konfluenten 293A HEK Zellen gegeben. Dabei nahm die Zahl der gebildeten Viruspartikel mit jeder Amplifikation



zu. Eine Überprüfung der Zellen auf die Expression der Fusionsproteine und auf zytopathische Effekte erfolgte täglich am Fluoreszenzmikroskop. Bei der Amplifikation zeigten sich die zytopathischen Effekte nicht mehr an einzelnen Stellen, sondern flächendeckend.

Für die erste Amplifikation wurde etwa ein Drittel des Virusstocks auf eine Flasche (75 cm<sup>2</sup>) Zellen gegeben. Von dieser ersten Amplifikation ausgehend wurden in der Regel vier Flaschen (75 cm<sup>2</sup>) 293A HEK mit je 1,5 ml zur Herstellung einer zweiten Amplifikation infiziert. Bei ausreichendem Titer im Bereich von etwa 10<sup>4</sup> Pfu/ml konnte diese zweite Amplifikation direkt verwendet werden, um die Herzmuskelzellen zu transduzieren. Alternativ erfolgte die Ankonzentrierung der Viren in Amicon Ultra-15 Säulen (Millipore, Schwalbach). Dabei befanden sich die Viren noch im Zellkulturmedium, welches mit 5 % FBS supplementiert war. Bei der Ankonzentrierung der Viruspartikel verblieben auch Serumproteine im Konzentrat. Da die Kultivierung der Herzmuskelzellen ohne Serum erfolgte, war eine Aufreinigung der Viruspartikel notwendig.

### 3.7.2 Reinigung adenoviraler Vektoren durch CsCl-Gradientenzentrifugation

Die Aufreinigung der Viruspartikel erfolgte in zwei zweistündigen Zonal-zentrifugationsschritten im CsCl-Stufengradienten.

Hierfür war eine dritte Amplifikation mit 10 bis 15 Flaschen (75 cm<sup>2</sup>) 293A HEK Zellen notwendig. Das gesamte Volumen wurde nach dem Zellaufschluss in Amicon Ultra-15 Säulen auf 6 ml ankonzentriert, die dann auf einen CsCl-Stufengradienten aufgetragen wurden.

**Tabelle 7: CsCl Lösungen**

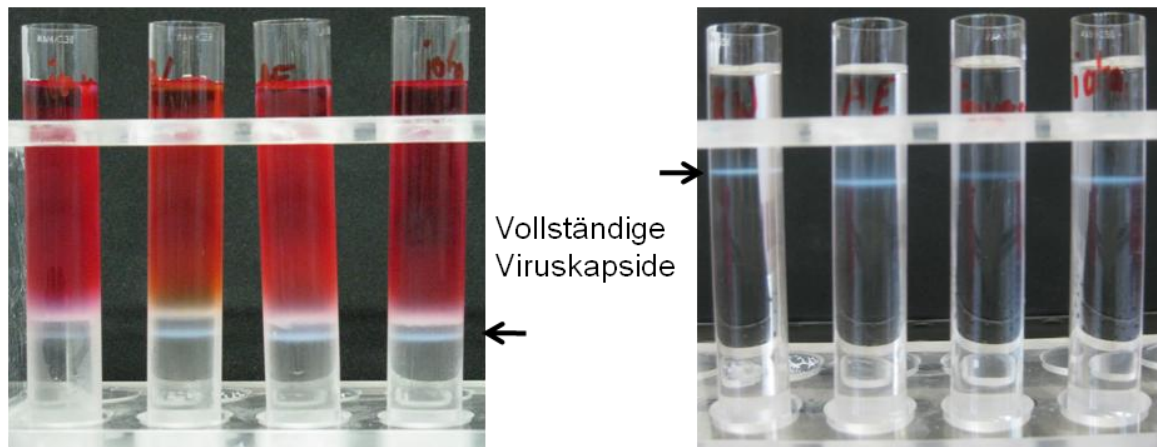
Lösung	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	% w/w	CsCl [g]	H <sub>2</sub> O [g]
1	1,2411	26	26	74
2	1,3393	34	34	66
3	1,4525	42	42	58

Der Gradient wurde durch sukzessives Unterschichten von drei Lösungen unterschiedlicher Dichte (Tabelle 7) in SW41 Röhrchen (Beckmann, Krefeld) aufgebaut. Mit einer 2 ml Spritze und einer Kanüle wurde 1 ml Lösung 1 mit 2 ml Lösung 2 und diese später mit 2 ml Lösung 3 unterschichtet. Auf diesen Gradienten wurden bis zu 6 ml Viruslösung aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte im SW41 Rotor bei 35000 rpm und 10 °C für 2 Stunden in der Ultrazentrifuge (UZ). Nach diesem Zentrifugationsschritt waren zwei weiße Banden zu erkennen, von denen die untere die intakten, DNS-haltigen Viruspartikel repräsentierte, während die obere Bande leere Viruscapside enthielt. Noch darüber befanden sich Mediumbestandteile, DNS und Proteine (Abbildung 9, links).

Mit einer 1000 µl Pipette wurde der Gradient bis knapp über die Bande der leeren Capside abgenommen. Die untere Bande wurde mit einer 1 ml Spritze und einer Kanüle mit 0,4 mm Außendurchmesser durch langsame, kreisende Bewegungen aufgenommen und das Volumen abgemessen. Das abgenommene Material wurde in SW41 Zentrifugenröhrchen gegeben, mit Lösung 2 auf ein Volumen von 1,5 ml gebracht und mit Lösung 3 auf 3 ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde mit 3 ml Lösung 2 und anschließend mit 2 ml Lösung 1 überschichtet.

Die Trennung erfolgte in der UZ bei 30000 rpm und 10 °C für 2 Stunden. Nach diesem Lauf war in der Regel nur noch eine einzelne Bande zu erkennen (Abbildung 9, rechts). In Einzelfällen gab es allerdings noch eine höhere Bande. Wenn beim Abnehmen der Viren nach dem ersten Zentrifugationsschritt die Bande mit den leeren Capsiden aspiriert wurde, bildeten diese nach dem zweiten Lauf erneut eine zweite Bande.

Die Bande mit den Viruspartikeln wurde erneut mit einer 1 ml Spritze und einer 27 gauge Kanüle in einem Volumen von etwa 1 ml abgenommen.



**Abbildung 9: Ergebnis der CsCl-Gradientenzentrifugation.** Links ist das Ergebnis nach dem ersten, rechts nach dem zweiten Zentrifugationsschritt abgebildet.

Zum Entfernen des CsCl wurde das abgenommene Material auf eine nach Herstellerangaben mit Adenovirus-Lagerungspuffer äquilibrierte NAP25-Säule (GE Healthcare, München) gegeben. Die Elution erfolgte nach Protokoll im gleichen Puffer in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml. Die Viren wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.7.3 Virustiterbestimmung

Um den Titer einzelner Virusamplifikationen zu bestimmen, wurden 293A HEK Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von 20 µl Viruslösung unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 100, 1000 in Duplikaten zu den Zellen. Ein Mediumwechsel nach zwei Stunden entfernte die Viren aus dem Zellkulturmedium. Zu diesem Zeitpunkt sollten alle Viruspartikel eine Zelle infiziert haben. Die Übersichtungung mit 5 % Agarose in Medium verhinderte, dass die von einzelnen Zellen produzierten Viren, sich frei im Medium bewegen und so weitere Zellen infizieren können. 48 Stunden nach Viruszugabe wurden die leuchtenden Zellen („Plaque forming units“ – Pfu) am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und daraus der Titer mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Pfu}/\mu\text{l} = \text{leuchtende Zellen} \times \text{Gesichtsfelder} \times \text{Verdünnung} / \mu\text{l Virus}$$

Leuchtende Zellen: Mittelwert aus 40 ausgezählten Gesichtsfeldern, 20 pro Well

Gesichtsfelder = insgesamte Anzahl der Gesichtsfelder in einem 6-Well:

385 für 20x Objektiv (Plan Fluor 20X/0.50 Ph1 DLC)

1540 für 40x Objektiv (Plan Fluor ELWD 40X/0.60 Ph2 DM)

### 3.8 Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1 Restriktion von Plasmid-DNS

Mit Hilfe der Restriktionsanalyse können DNS-Moleküle charakterisiert werden. Grundlage ist die Fähigkeit von Restriktionsendonukleasen DNS an genau definierten Stellen zu spalten. Jede Restriktionsendonuklease besitzt eine spezifische Basenerkennungssequenz, in oder in deren Nähe sie die Spaltung der doppelsträngigen DNS katalysiert. Die dadurch entstehenden Fragmente haben eine, durch die Lage der Schnittstellen in der DNS definierte Größe und können durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Restriktionen von Plasmid-DNS mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden stets nach Herstellerangaben im entsprechenden Puffer mit entsprechenden Mengen an Enzym bei 37 °C unter Schütteln durchgeführt.

**Tabelle 8: Verwendete Restriktionsenzyme**

Restriktionsendonuklease	Hersteller	Schnittstelle
Apal	Fermentas	GGGCC↓C
Cfr9I	Fermentas	C↓CCGGG
DpnI	Fermentas	Gm6A↓TC
EcoRI	Fermentas	GAT↓ATC
NotI	Fermentas	GC↓GGCCGC
PacI	New England Biolabs	TTAAT↓TAA

### 3.8.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

In einem Agarosegel können DNS-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Die Agarose dient dabei als Trägermaterial. Durch Anlegen einer Spannung wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Hierbei kommt es zu einer Größenauftrennung der Fragmente im Gel, da die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der Moleküle abhängt. Große Moleküle werden durch die Gelmatrix stärker retardiert, während kleine im elektrischen Feld schneller durch die Poren des Agarosegels wandern können. Anhand von Größenstandards kann die Größe linearer DNS-Fragmente abgeschätzt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid zur Agarose ermöglicht nach Interkalation in doppelsträngige DNS die Visualisierung unter UV-Licht.

Standardmäßig wurden für die Elektrophorese von DNS Gele mit 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer verwendet. Für besonders große Fragmente wurden 0,5 % (w/v) Agarose eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100 V und Raumtemperatur, wobei die Dauer je nach Größe der Fragmente variierte. Als Größenstandard diente der Gene Ruler 1 kb DNS Standard (Fermentas, St. Leon-Rot). Dieser ermöglicht die Größenbestimmung von Fragmenten zwischen 0,25 kb und 10 kb.

### 3.8.3 Isolation von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel

Im Agarosegel aufgetrennte DNS-Fragmente, die für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung stehen sollten, wurden mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll aus dem Gel gelöst. Dabei kam es zunächst zur Auflösung der Agarose in einem speziellen Puffer bei 50 °C, bevor die Lösung auf eine Säule gegeben wurde. Die DNS band dabei an die Säulenmatrix. Im Anschluss an zwei Waschschrte erfolgte die Elution von der Säule. Je nach Dicke der ausgeschnittenen Bande wurde die DNS in 30 µl oder 50 µl Wasser aufgenommen.

### 3.8.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Durch eine Ligationsreaktion können DNS-Fragmente miteinander verbunden werden. Viele Restriktionsendonukleasen produzieren Enden mit 3'- oder 5'-Überhängen. Sofern die Enden der DNS-Fragmente kompatibel sind, also entweder keine, oder komplementäre Überhänge aufweisen, können sie durch DNS-Ligasen miteinander verknüpft werden. Für die Klonierungen wurde die T4 Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolgte eine Stunde bei 22 °C oder über Nacht im Kühlschrank. Gegebenenfalls war eine Dephosphorylierung der Enden des Vektors zuvor erforderlich. Dies verhinderte die Religation des linearisierten Vektors und war daher nur sinnvoll, wenn beide Enden des geöffneten Vektors kompatibel waren. Zur Dephosphorylierung wurde anschließend an den Restriktionsverdau 1 µl CIAP (Fermentas, St. Leon-Rot) zu dem Ansatz gegeben und 30 Minuten unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

### 3.8.5 Transformation von Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden zwischen 10 und 50 ng Plasmid-DNS in chemisch kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterien eingebracht. 100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der Plasmid-DNS 20 Minuten auf Eis inkubiert. Während einem Hitzeschock bei 42 °C für eine Minute nahmen die Bakterienzellen die DNS von außen auf. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis, wurden 900 µl vorgewärmtes antibiotikafreies LB Medium zu den Zellen gegeben und diese für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. In dieser Zeit vermehren sich die Bakterien bereits und sind in der Lage, die auf dem Plasmid kodierte Antibiotika-Resistenz zu entwickeln. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB Platten mit dem passenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus den vereinzelter Bakterien wachsen gut sichtbare Kolonien heran. In einer einzelnen Bakterienkolonie tragen alle Zellen dasselbe Plasmid.

### 3.8.6 Isolation von Plasmid-DNS aus Bakterien

Die Anzucht der Bakterien für die Isolierung von Plasmid-DNS erfolgte ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie in Flüssigkultur mit dem geeigneten Antibiotikum. Je nach Bedarf wurden das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) mit 2 bis 5 ml Bakterienkultur oder das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) mit 100 bis 600 ml Bakterienkultur nach Herstellerprotokoll verwendet. Dabei reichten 100 ml zur Anzucht von „high copy“-Plasmiden, während für „single copy“-Plasmide 600 ml notwendig waren.

### 3.8.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

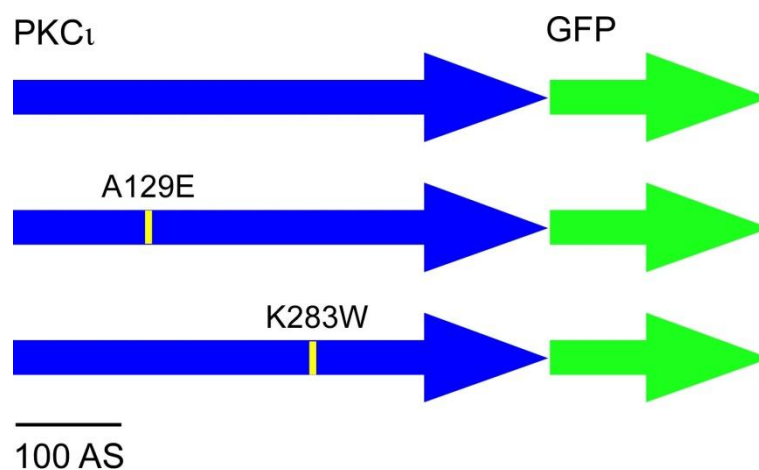
Die Quantifizierung von DNS und RNS Proben erfolgte durch Messen der Extinktion bei 260 nm im Photometer. Eine optische Dichte bei 260 nm ( $OD_{260\text{ nm}}$ ) von 1 entspricht einer DNS-Konzentration von 50 µg/µl und einer RNS-Konzentration von 40 µg/µl. Das Absorptionsverhältnis  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  gibt die Reinheit der Probe an. Das optimale Absorptionsverhältnis für eine proteinfreie Nukleinsäure-Probe liegt zwischen 1,8 und 2,0. Die Messungen erfolgten mit der Hellma Tray Cell Küvette, für die nur 3 µl Probe verwendet werden müssen.

### 3.8.8 Klonierung von Fusionsproteinen

Die cDNS der humanen PKC $\alpha$  wurde in einen bereits vorhandenen pcDNA3-GFP-Vektor N-terminal des Fluoreszenzproteins eingebracht. Das Stop-Codon der Protein Kinase wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entfernt, und gleichzeitig eine Restriktionsstelle zur Klonierung eingefügt. Anschließend wurde die cDNS des Fusionsproteins vollständig ausgeschnitten und in den pCR259-Vektor eingebracht. Das Entfernen des Stop-Codons verhinderte die Termination der Translation am C-Terminus der Protein Kinase und ermöglichte dadurch die Synthese des Fusionsproteins. Die Translation endete somit erst am Stop-Codon

des Fluoreszenzproteins. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Leserahmen des Fluoreszenzproteins erhalten blieb.

Durch eine PCR war es möglich, Restriktionsstellen an einer beliebigen Position einzufügen. Die hierfür verwendeten Primer mussten neben dem zur Ziel-DNS komplementären Abschnitt zusätzlich noch die Sequenz für die Schnittstelle enthalten. Beim Auswählen solcher Primer ist es wichtig die Schmelztemperatur des im ersten Zyklus anheftenden Teils für die PCR-Reaktion zu wählen.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der klonierten Fusionsproteine.** Die Protein Kinase C $\iota$  (blau) wurde mit einem C-terminalen GFP (grün) kloniert. Zusätzlich wurden zwei Mutantenformen A129E und K283W kloniert. Die Länge der Pfeile gibt die Länge der Aminosäurekette wieder.

### 3.8.9 Zielgerichtete Mutagenese

Um Mutationen aus der cDNS-Sequenz bestimmter Proteine zu entfernen oder gezielt einzubringen, wurde das QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Waldbronn) nach Herstellerangaben verwendet.

Mit dieser Methode können Punktmutationen in doppelsträngige Plasmide eingefügt werden, sowie Aminosäureaustausche und das Entfernen oder Einbringen einzelner Aminosäuren vorgenommen werden. Dazu werden Oligonukleotide mit den gewünschten Mutationen verwendet. In einem ersten Schritt wird die Plasmid-



DNS denaturiert. Bei 55 °C erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide, die bei 68 °C von der Pfu Turbo<sup>®</sup> DNS Polymerase verlängert werden. Diese Polymerase repliziert beide DNS-Stränge mit hoher Genauigkeit, ohne die Oligonukleotide zu verdrängen. Die beiden Primer sind dabei exakt komplementär zueinander und binden daher an komplementären Stellen der beiden Stränge. Durch den Einbau der mutierten Oligonukleotide entstehen Plasmide mit den gewünschten Mutationen. Anschließend an das Temperaturprogramm folgt die Restriktion mit dem Enzym DpnI, welches durch seine Spezifität für methylierte DNS nur die parentale DNS spaltet, während die neu synthetisierte, mutierte DNS intakt bleibt.

1 µl des Ansatzes wurde in XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert, wobei nach dem Hitzeschock nach Herstellerempfehlung NZY+ anstatt LB Medium Verwendung fand. Der Transformationsansatz wurde jeweils zur Hälfte auf zwei LB Platten mit dem passenden Antibiotikum ausplattiert. Aus einzelnen Kolonien wurden Plasmide isoliert und der Erfolg der Reaktion durch Sequenzierung überprüft.

Durch die zielgerichtete Mutagenese wurden Mutanten der PKC<sub>ι</sub> hergestellt, die konstitutiv-aktiv oder dominant-negativ sind.

**Tabelle 9: Primer für zielgerichtete Mutagenese**

Name	Nukleotidsequenz in 5'→ 3' Richtung
hPKC <sub>ι</sub> A119E for	CCATCTACCGTAGAGGTGAACGCCGCTGGAGAAAGC
hPKC <sub>ι</sub> A119E rev	GCTTTCTCCAGCGGCGTTCACCTCTACGGTAGATGG
hPKC <sub>ι</sub> K282W for	GATCGTATTTATGCAATGTGGGTTGTGAAAAAAGAGCTTG
hPKC <sub>ι</sub> K282W rev	CAAGCTCTTTTTTCAACCCACATTGCATAAATACGATC

### 3.8.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine sehr effektive Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Grundlage dieser Methode ist die Fähigkeit von DNS-Polymerasen, DNS zu

duplizieren. In einem zyklischen Prozess aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung verdoppelt sich die Kopienzahl des gewünschten DNS-Abschnittes unter optimalen Bedingungen theoretisch mit jedem Zyklus.

In einem ersten Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNS bei 95 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Anlagerung spezifischer Oligonukleotide an die einzelsträngige DNS bei einer Temperatur, die knapp unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide liegt. Die DNS-Polymerase ist in einem dritten Schritt bei ihrer optimalen Katalysetemperatur von 72 °C in der Lage, die freien 3'-OH-Enden der Primer komplementär zum Matrizenstrang in 5'→3'-Richtung zu verlängern. Diese Schritte werden 20 bis 40 Mal wiederholt, wobei die Kopienanzahl unter optimalen Bedingungen mit jeder Runde exponentiell zunimmt. Die PCR-Reaktion kann anschließend durch Gelelektrophorese analysiert und das gewünschte DNS-Fragment durch Ausschneiden aus dem Agarosegel gewonnen werden.

### 3.8.10.1 Klon-PCR

Bei der Klon-PCR wird anstatt isolierter DNS als Ausgangspunkt für die Amplifikation die Bakterienkultur selbst verwendet. Es handelt sich um eine zeitsparende und effektive Methode, um nach einer Klonierung positive Klone zu identifizieren.

Die nach einer Transformation gewachsenen Kolonien werden mit einem Zahnstocher gepickt, zur Erhaltung auf eine frische Platte überstrichen und der Zahnstocher anschließend für eine Minute in den PCR-Mix getaucht. Dabei lösen sich genügend Bakterien, deren Plasmid-DNS in der PCR-Reaktion nachgewiesen werden kann. Zum Aufschluss der Bakterien wird der initiale Denaturierungsschritt auf 4 bis 5 Minuten verlängert.

### 3.8.10.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide oder Primer sind DNS-Sequenzen mit einer Länge zwischen 18 und 30 Basenpaaren, die an die zu amplifizierende DNS binden und von DNS-Polymerasen komplementär zur Template-DNS verlängert werden.

Die Sequenz der Primer wurde so ausgesucht, dass ihre Schmelztemperatur zwischen 54 °C und 61 °C liegt und ihr GC-Gehalt mindestens 50 % beträgt. Soweit dies möglich ist, sollten Primer so gewählt werden, dass an ihrem 3'-Ende zwei bis drei Guanin- (G) oder Cytosin- (C) Nukleotide vorkommen. Zwischen ihnen entsteht eine stärkere Bindung, als zwischen Adenin- (A) und Thymin- (T) Nukleotiden, was die Spezifität der Anlagerung erhöht.

**Tabelle 10: PCR-Primer und deren Nukleotidsequenz**

Name	Nr.	Nukleotidsequenz in 5'→ 3' Richtung
pcDNA3for	34	GAACCCACTGCTTACTGGCTTATCG
pcDNA3rev	35	GAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA
YFP/GFPprev	51	CTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pCR259Seqfor	138	CCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGC
pCR259Seqrev	139	CAAACATCATCAATGTATCTTATCATGTCTGC
iota2	166	GCACGCCTGTTGAAACGCTTG
hioTFwERI	227	GGGGAATTCGTGGGCGGACGGCCGC
hioTrevNI	228	CCCCGCGGCCGCAGACACATTCTTCTGCAGACATCAA AAGAG
Apal-mCherry	234	AAGGGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
M13/pUCfor-2	336	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13/pUCrev-2	337	AGCGGATAACAATTCACACAGG
GFP_Xmal	446	TCTCCCGGGCTAGCATTAGGTGACACTAT

### 3.8.11 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR basiert auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, wobei die Amplifikation der Nukleinsäuren bei dieser Methode in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Quantifizierung erfolgt am Ende oder während eines jeden PCR-Zyklus. Grundlage der Quantifizierung ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, wobei die Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Das in dieser Arbeit verwendete System beruht auf der DNS-Bindung des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green, welches sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet.

Die qPCR wurde für Genexpressionsanalysen von chronisch stimulierten adulten Ratten-Kardiomyozyten angewandt. Der Einfluss der chronischen Stimulation mit Endothelin-1 und Phenylephrin auf die Expression von Phospholipasen C, Protein Kinasen C, Protein Kinasen D (PKD) und einiger anderer Gene wurde im Zeitverlauf der Stimulation untersucht.

#### 3.8.11.1 Sammlung und Aufbereitung der Proben

Ratten-Kardiomyozyten wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und wie zuvor beschrieben kultiviert. Zwei Stunden nach dem ersten Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von 100 µM Phenylephrin oder 100 nM Endothelin-1. An definierten Zeitpunkten am Tag der Isolation (DIV 0), sowie an den Tagen 1, 3 und 6 *in vitro* (DIV) wurden die Zellen durch Abspülen geerntet, bei 150 x g im Ausschwingrotor sedimentiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 11: Kultivierungsbedingungen der Myozyten für die qPCR-Analysen**

Behandlung	Zeitpunkt der Probennahme			
-	DIV 0	DIV 1	DIV 3	DIV 6
100 µM Phenylephrin	DIV 0	DIV 1	DIV 3	DIV 6
100 nM Endothelin-1	DIV 0	DIV 1	DIV 3	DIV 6

### 3.8.11.2 RNS Präparation

Die Isolation von Gesamt-RNS wurde mit dem RNeasy<sup>®</sup> Micro Kit (Qiagen, Hilden) für besonders geringe Probenmengen nach dem Protokoll für fibröses Gewebe durchgeführt. Der Lysepuffer wurde direkt zu den noch gefrorenen Zellen gegeben und das Lysat zum Homogenisieren mehrfach durch eine 200 µl Pipettenspitze auf und ab pipettiert. Für die Elution der RNS von der Säule wurden jeweils 14 µl RNase freies Wasser verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der RNS erfolgte im Photometer durch Messen der Absorption bei 260 nm. Das Absorptionsverhältnis  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  gibt die Reinheit der Probe an und lag bei allen Präparationen zwischen 1,7 und 2,0.

### 3.8.11.3 cDNS Synthese

Das Umschreiben der RNS in cDNS erfolgte mit dem IScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit (Biorad, München) mit einem Mix aus Oligo-dT Primern und Random Hexamer-Primern. Oligo-dT Primer lagern sich an den Poly-A Schwanz der mRNA an, während die zufällige Nukleotidabfolge der Random Hexamer-Primer dazu führt, dass diese an unterschiedlichen Stellen auf der mRNA binden, die eine komplementäre Nukleotidsequenz aufweisen. Durch diese spezielle Mischung wird eine besonders hohe Effizienz für die Synthese aller cDNS-Moleküle gewährleistet.

Um exakt gleiche Bedingungen und damit gleiche Effizienz der Reaktionen zu gewährleisten, wurden alle Proben zusammen prozessiert. Für Proben, die später

im direkten Vergleich stehen sollten (chronische Stimulation versus Kontrolle), war es wichtig, zudem jeweils gleiche Mengen an RNS in die cDNS Synthese einzusetzen.

### 3.8.11.4 qPCR-Reaktion

In die PCR-Reaktion wurden jeweils 3,3 ng cDNS eingesetzt. Dabei galt die Annahme, dass die Effizienz der cDNS Synthese 100 % betrug, also genauso viel cDNS entstanden ist, wie RNS zum Einsatz kam. Die Proben wurden mit Wasser auf 0,33 ng/µl verdünnt und von dieser Verdünnung 10 µl in die PCR eingesetzt. Aus den Einzelkomponenten wurde ein Mastermix hergestellt und 10 µl pro Reaktion in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu kamen jeweils 10 µl Probe oder Wasser. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Zusätzlich gab es zu jeder Probe mit jedem Primerpaar eine Wasserkontrolle („no template control“), sowie eine RNS-Kontrolle mit derselben Konzentration wie die der cDNS (- Reverse Transkription). Sollte in der Wasserkontrolle ein Signal zustande gekommen sein, bedeutete dies, dass es zwischen den Primern zur Dimerbildung kam. Da SYBR Green unspezifisch in jede doppelsträngige DNS interkaliert, kam es so zu einem Fluoreszenzsignal. Mit Hilfe der RNS-Kontrolle wurde die Reinheit der RNS überwacht. War die RNS-Probe mit genomischer DNS kontaminiert, entstand auch hier ein Fluoreszenzsignal. Nur wenn beide Kontrollen negativ waren, wurde die Messung ausgewertet.

Als weitere Kontrolle wurde ROX als Referenzfarbstoff mit in die Reaktion gegeben. Die Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes sollte während der kompletten Amplifikationsreaktion konstant bleiben, da kein Zusammenhang mit Amplifikationseffekten oder der DNS Menge besteht. Dadurch können geringe Schwankungen beispielsweise durch Reflektionen oder Unregelmäßigkeiten in der Transparenz der Plastikware heraus gerechnet werden. Eine Normalisierung auf das ROX Signal war nicht notwendig, da in den Reaktionen keine Auffälligkeiten oder Unregelmäßigkeiten des Signals zu beobachten waren.

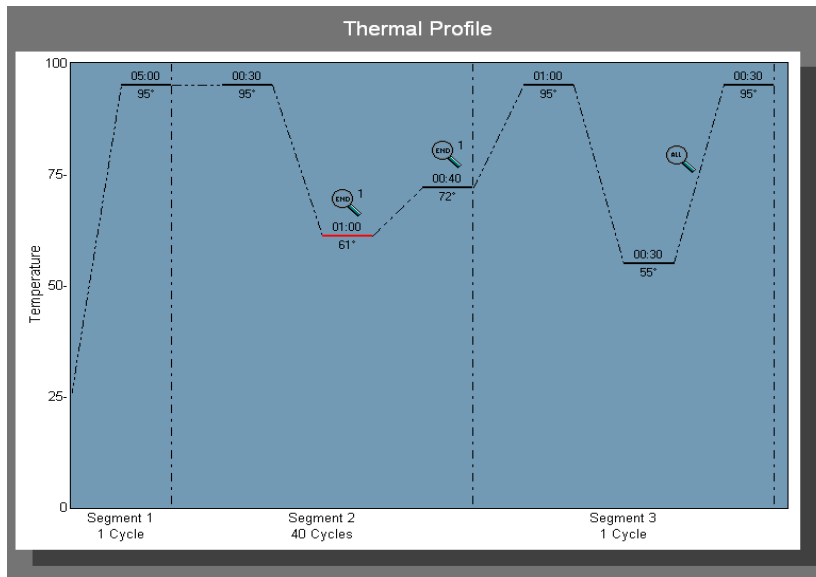
### Reaktionsansatz

10x Platinum Puffer	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6 µl
SYBR Green (1:2000 in H <sub>2</sub> O)	0,6 µl
ROX (1:500 in H <sub>2</sub> O)	0,4 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl
Platinum Taq Polymerase	0,1 µl
Forward Primer (10 µM)	0,6 µl – 0,8 µl (primerabhängig)
Reverse Primer (10 µM)	0,6 µl – 0,8 µl (primerabhängig)
Wasser	auf 10 µl auffüllen
Probe	10 µl

Die PCR-Reaktionen wurden im MX3000P Cycler von Stratagene mit dem Programm ‚SYBR® Green mit Dissoziationskurve‘ aus den Experimentoptionen durchgeführt. Anhand der Dissoziationskurve wurde nach jedem Lauf die Reliabilität des Fluoreszenzsignals ausgewertet. Nur wenn diese einen scharfen Peak abbildete, galt die Messung als zuverlässig.

#### **3.8.11.5 PCR-Programm**

Abbildung 11 zeigt ein typisches Temperaturprofil für die SYBR Green PCR mit Dissoziationskurve. Im ersten Segment erfolgt die initiale Denaturierung der cDNS. Das zweite Segment beinhaltet die komplette Polymerase-Kettenreaktion mit 40 Zyklen, wobei nach jedem Zyklus eine Fluoreszenzmessung erfolgt. Im dritten und letzten Segment wird die Schmelzkurve jeder Probe aufgezeichnet.



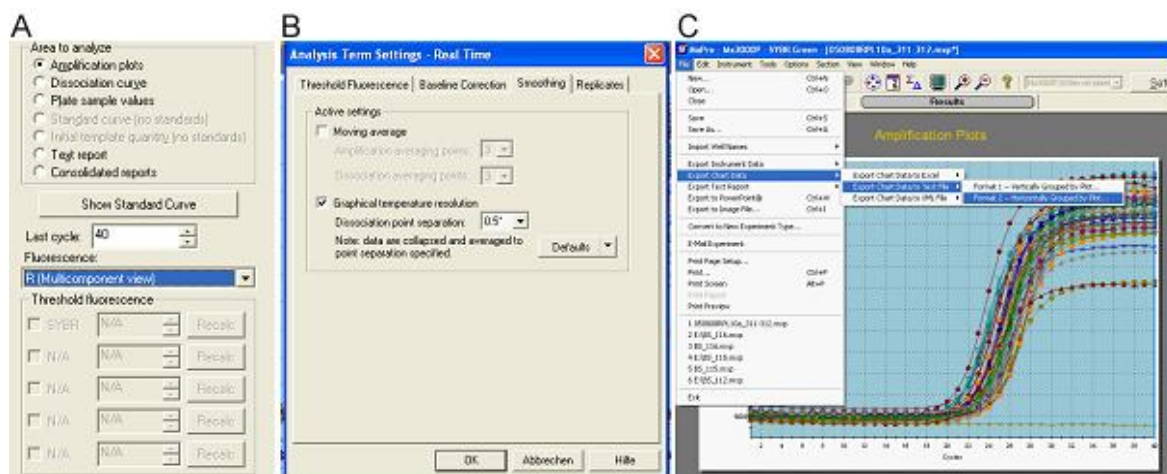
**Abbildung 11: Typisches Temperaturprofil der qPCR mit SYBR Green inklusive Dissoziationskurve.** Die qPCR mit SYBR Green mit Aufzeichnung der Dissoziationskurven besteht aus 3 Segmenten: 1) der initialen Denaturierung, 2) der PCR mit Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation und 3) der Erstellung der Schmelzkurve.

Bei einer Schmelzkurvenanalyse werden alle generierten Produkte bei 95 °C geschmolzen, anschließend bei 55 °C wieder zusammen gelagert und dann schrittweisen Temperaturerhöhungen ausgesetzt. Während dieser Temperaturerhöhungen werden Fluoreszenzdaten gesammelt, bis die Reaktion bei 95 °C wieder beendet wird. Die negative erste Ableitung der Fluoreszenzrohdaten gegen die Temperatur aufgetragen, ergibt die Schmelzkurve der PCR-Produkte, welche unter ‚Analysis‘ abgerufen werden kann. Aus dieser Kurve kann die Temperatur abgelesen werden, bei der die entstandenen DNS-Doppelstränge dissoziieren. Sie sollte daher nur einen scharfen Peak bei der Dissoziationstemperatur des spezifischen PCR-Produktes abbilden. Sofern während der PCR-Reaktion Primer-Dimere oder unspezifische Produkte entstanden sind, die das Fluoreszenzsignal verfälschen, kann dies anhand der Dissoziationskurve identifiziert werden.



## 3.8.11.6 Auswertung

Nach jedem Lauf wurden zunächst die Schmelzkurven, sowie die Kurven des Referenzfarbstoffes ROX überprüft. Sofern die Schmelzkurven jeweils einen scharfen Peak aufwiesen und die ROX Daten keine Unregelmäßigkeiten erkennen ließen, wurden die SYBR Rohdaten als Textdateien exportiert. Dazu wurden die ROX Daten aus der Übersicht entfernt und bei Anklicken der Ergebnisse die in Abbildung 12 A angezeigten Einstellungen gewählt. Das Auswählen von ‚R‘ unter Fluoreszenz, führte zum Entfernen des vom Programm gesetzten Schwellenwertes, sodass nur die Rohdaten stehen blieben. Unter ‚Optionen, Analysis Term Settings‘ wurden die Einstellungen nach Abbildung 12 B gesetzt. Das Exportieren der Daten erfolgte nach dem in C abgebildeten Pfad.

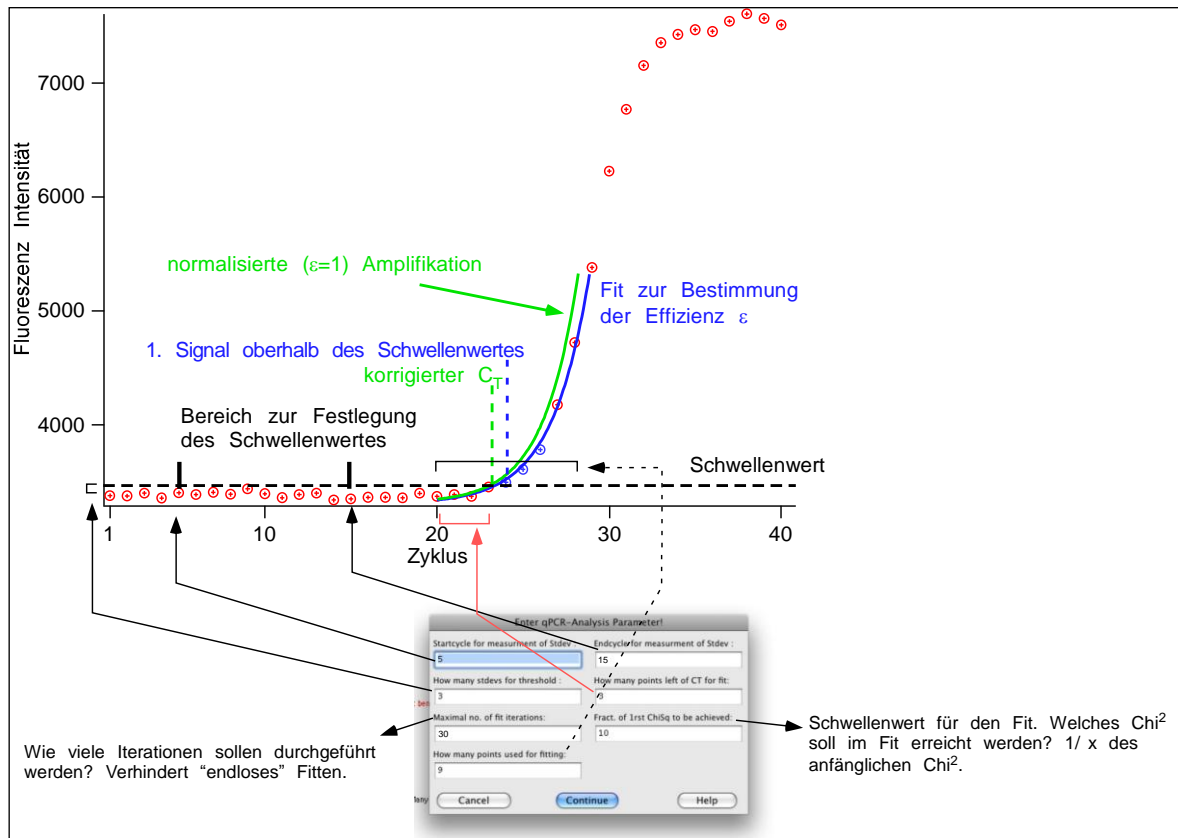


**Abbildung 12: Einstellungen zum Exportieren der Rohdaten der Amplifikationskurven.** **A** Unter ‚Results‘ werden die Amplifikationsplots ausgewählt und als letzten Zyklus 40 eingestellt. Durch Auswählen von ‚R (multicomponent view)‘ bei den Fluoreszenzdaten wird der vom Programm gesetzte Schwellenwert entfernt, es werden also nur die Rohdaten ausgewählt. **B** In ‚Options, Analysis Term Settings‘ wird beim Smoothing das voreingestellte Häkchen für ‚Moving average‘ entfernt. **C** Das Exportieren der ausgewählten Rohdaten erfolgt über den angegebenen Pfad.

Die Auswertung der Daten erfolgte in dem Programm Igor Pro 6.10. Dazu wurden die Textdateien in das Programm geladen und nach den in Abbildung 13 angegebenen Parametern analysiert.

Zunächst wurde die exponentielle Phase der Amplifikationskurve angepasst und daraus die Effizienz  $\varepsilon$  der Reaktion ermittelt. Eine Effizienz von  $\varepsilon=1$  bedeutete dabei eine Verdoppelung der PCR-Produkte nach jedem Zyklus. In der Regel lag die Effizienz nur geringfügig unter 1. Aus dieser Anpassung wurde durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz der Basislinie zusammen mit deren Standardabweichung ( $\sigma$ ) der Schwellenwert (threshold) der Reaktion berechnet. Der Schwellenwert, bei dem das Fluoreszenzsignal das Rauschen übersteigt, wurde für jede Messung auf  $3\sigma$  gesetzt. Durch Festsetzen von  $\varepsilon=1$  wurde anschließend der  $C_T$ - („cycle threshold“) Wert neu berechnet. Dieses standardisierte Verfahren der Normalisierung bot den Vorteil, dass die Effizienz und der Schwellenwert für jede einzelne PCR-Reaktion unabhängig bestimmt werden konnten. Es wurden also jegliche Schwankungen in der Effizienz, sowie der Fluoreszenz der Basislinie berücksichtigt, was die Auswertung sehr verlässlich macht.

Der  $C_T$ -Wert gibt an, nach welchem Zyklus die Fluoreszenz erstmals über den Schwellenwert ansteigt. Anhand dieses Wertes erfolgt die quantitative oder semi-quantitative Auswertung der Ergebnisse. Je niedriger der  $C_T$ -Wert ist, desto höher ist die Kopienzahl des untersuchten Gens, wobei eine  $C_T$ -Wert Erniedrigung um 1 eine Zunahme der Transkripte um 100 % bedeutet.



**Abbildung 13: C<sub>T</sub>-Wert Normalisierung.** Die Einstellungen zur Berechnung des C<sub>T</sub>-Wertes in Igor Pro und der Prozess der Normalisierung sind abgebildet.

Die in Igor Pro berechneten, korrigierten C<sub>T</sub>-Werte wurden anschließend auf 3 Housekeeping- (HK) Gene normiert.

Vor der Auswahl der HK-Gene wurden diese getestet und auf ihre Tauglichkeit als solche überprüft. Mittlerweile stellt die Normierung auf mehrere Housekeeping-Gene die übliche Praxis bei qPCR-Analysen dar. Besonders bei der Detektion geringer Änderungen ermöglicht das Verwenden mehrerer Referenzgene eine genauere und verlässlichere Quantifizierung, als es mit nur einem möglich ist.

Nach der Validierung geeigneter HK-Gene wurden diese zur Normierung der Zielgen-C<sub>T</sub>-Werte genutzt. Hierzu wurde aus den C<sub>T</sub>-Werten von 3 HK-Genen der Exponent der arithmetischen Mittelwerte berechnet und dieser dann für die Normierung verwendet. Dabei wurde der aus den Referenzgen-C<sub>T</sub>-Werten berechnete Exponent von dem jeweiligen Zielgen-C<sub>T</sub>-Wert subtrahiert.

Zusätzlich wurde getestet, ob ein Poolen von Proben mit gleicher Behandlung aber von verschiedenen Ratten möglich ist. Hierzu wurden Proben von 5 Ratten jeweils einzeln und gepoolt auf die Expression einzelner exemplarischer Gene getestet. Um eine genaue Aussage treffen zu können, wurden von den Proben der einzelnen Tiere, sowie der gepoolten Proben jeweils 10 Parallelmessungen durchgeführt. Mit einem  $\text{Chi}^2$ -Test für Randsummen wurden die Ergebnisse der Messungen statistisch analysiert und auf Gleichverteilung geprüft. Da es keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten zwischen den einzelnen Tieren gab und auch keine der Einzelmessungen signifikant von den Messwerten der gepoolten Proben abwich, war sichergestellt, dass es hinsichtlich der drei getesteten Gene zwischen einzelnen Tieren keine Unterschiede gab und ein Poolen somit erlaubt war. Daher wurde die RNS einzelner Proben gepoolt und gemeinsam in cDNS umgeschrieben, die dann in die qPCR eingesetzt wurde.

Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Um eine zuverlässige Aussage über signifikante Änderungen zwischen den Kontrollen und den behandelten Zellen zu erhalten, wurde zunächst überprüft, ob die beiden Parallelmessungen (sowohl Kontrolle als auch Behandlung) an sich nicht schon unterschiedlich waren. Hierfür wurde ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für die Unterschiedsprüfungen der Lokationswerte angewandt, der eigens für die spezielle Datenlage erstellt wurde. Dieser Test bewertet die Gleichheit zentraler Tendenzwerte (Mediane). Er geht von einem Gleichgewicht aus, in dem sich die Differenzen der jeweiligen Parallelwerte mit positivem und negativem Vorzeichen die Waage halten. Für den Fall, dass das Gleichgewicht gestört ist, wird berechnet wie wahrscheinlich es ist, dass die Störung vorkommt. Dabei wird nicht nur die Richtung der Differenz (Vorzeichen) sondern durch Zuweisung eines Ranges auch deren Höhe berücksichtigt. Ein Unterschied wird auf dem jeweiligen Signifikanzniveau überzufällig (also statistisch signifikant), wenn der empirische T-Wert den kritischen Wert erreicht oder unterschreitet. Als Signifikanzniveau wurde hier ein Fehler von 6 % festgelegt.

Für den Fall, dass sich die Parallelmessungen nicht signifikant unterschieden, wurden für die weiteren Analysen die Mittelwerte aus beiden verwendet. Bei den Messungen, bei denen sich hier bereits Unterschiede ergaben, wurden für den

Vergleich zwischen Kontrolle und Behandlung jeweils alle Einzelwerte gegeneinander geprüft.

Für die weitere Analyse wurden daher entweder die jeweiligen Mittelwerte in den Wilcoxon-Test eingesetzt und so eine Messreihe Kontrolle gegen eine Messreihe Behandlung gegeneinander getestet. Oder es wurden jeweils 2 Messreihen Kontrolle gegen 2 Messreihen Behandlung einzeln gegeneinander analysiert. In diesen Fällen wurde nur dann von signifikanten Änderungen ausgegangen, wenn diese zwischen allen Paaren detektiert wurde. Damit wurde also geprüft, ob eine Reihe systematisch höher oder niedriger lag als die andere. Ob also die Hormonzugabe eine signifikant höhere oder niedrigere Expression der einzelnen Zielgene im Vergleich zu unbehandelten Zellen bewirkte. Über den zeitlichen Verlauf und eventuelle Änderungen über die Kultivierungsdauer konnte durch diesen Test allerdings keine Aussage getroffen werden.

Daher wurde zusätzlich ein  $\chi^2$ -Test entwickelt, mit dem Änderungen über die Kultivierung detektiert werden konnten. Zunächst wurden dabei in einem ersten Schritt die Kontrollmessungen auf die Annahme der Gleichverteilung bei einem Fehler von 5 % geprüft. Die Nullhypothese war hier also, dass sich über die Kultivierungsdauer nichts ändert (Waagerechte). In einem weiteren Test wurden dann in einem  $\chi^2$ -Test für Randsummen die Verteilung der Behandlung und der Kontrolle auf Abweichung voneinander getestet. Auch hier wurde als Signifikanzniveau 5 % gewählt. In diesem zweiten Test war die Nullhypothese also die Verteilung der Kontrolle. In diesem Analyseverfahren wurden die Abstände zwischen den jeweiligen Messpunkten erfasst, weshalb so die Charakteristik der Verteilungen beurteilt werden konnte, während der Wilcoxon-Test nur Änderungen erfasste, die auf den Differenzen zwischen den Messwerten beruhten.

Die eigens auf die spezielle Datenlage zugeschnittene Strategie zur statistischen Auswertung wurde von Dr. Franz Reither entwickelt, der auch die Programmierung aller hierfür erforderlichen Tests übernahm.

In einem abschließenden Schritt wurden die  $\Delta C_T$ -Werte zwischen Kontrolle und Behandlung ( $\Delta C_T = C_T \text{ Kontrolle} - C_T \text{ Behandlung}$ ) berechnet, um die Unterschiede zwischen beiden herauszustellen.

### 3.8.11.7 Oligonukleotide

Die in der qPCR verwendeten Primer wurden so gewählt, dass die Amplikonlänge zwischen 100 und 150 Basenpaaren lag. Wenn möglich wurden die Primer auf aufeinanderfolgenden Exons platziert, was sicherstellte, dass kein Produkt aus genomischer DNS entstehen konnte. Die dazwischen liegenden Introns sollten mehrere tausend Basenpaare lang sein. Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, wurden Primer mit mehreren Guanin- oder Cytosinresten am 3'-Ende bevorzugt, da hierdurch eine festere Bindung erreicht wird. Die Datenbankrecherche über die PLCs sowie die Auswahl der PLC-Primer wurde von Sandra Ruppenthal durchgeführt. Die Primer für das saure ribosomale Phosphoprotein P0 (Arbp), das ribosomale Protein L10a (Rpl10a) und SERCA wurden von Cedric Viero übernommen.

**Tabelle 12: qPCR-Primer mit Nukleotidsequenz und Annealing Temperatur**

Name	Interne Nummer	Nukleotidsequenz in 5'→ 3' Richtung	Annealing Temp [°C]
HPRT for	478	CTGACCTGCTGGATTACATTAAAGCG	60
HPRT rev	479	CCAGTTAAAGTTGAGAGATCATCTCCACC	60
RPL10a for	311	GTAAGCGCCGCAAGTTTCT	61
RPL10a rev	312	AGGGGTGGACTTAAGCCTGA	61
Arbp for	112	TGAGGTCACAGTACCTGCTCAGAACAC	61
Arbp rev	113	CAGGATTTCAATGGTACCTCTGGAGATT	61
Prdx2 for	500	CCACGGAGATCATCGCTTTTAGC	60
Prdx2 rev	501	CCAGGTGGGTGAACTGAGAGTCC	60
Serca2a for	309	GTGGAACCTTTGCCACTCAT	58
Serca2a rev	310	TTGCAGGCTCCAGGTAGTTT	58
Nebulette for	474	GTGAGGTAACAAGACCATCTGATGAAGG	60
Nebulette rev	475	CTGAATGCTGCATTGACCTCACG	60
Actc1 for	480	GATGATGCTCCCAGAGCTGTCTTC	60
Actc1 rev	481	CGCTTGCTCTGAGCCTCGTCAC	60
PKC $\alpha$ for	400	GAGGATCGACTGGGAGAAGTTGG	57

PKC $\alpha$ rev	401	GCTGATCTGGTGGTGTTAAGACAGG	57
PKC $\beta$ for	402	GGATGAACTCTTCCAGTCAATCATGG	61
PKC $\beta$ rev	403	CCCCTTCAGGCCCAACC	61
PKC $\gamma$ for	410	CGAATTTGTGACCTTCGAGTGTCC	61
PKC $\gamma$ rev	411	GGAACCACAGTGGTCGCAGAAG	61
PKC $\delta$ for	404	GCTGGGAGTAACAGGAAACATCAGG	58
PKC $\delta$ rev	405	GGGTCAAAGTTGCTGTAGTCTGAAGG	58
PKC $\epsilon$ for	406	GCAAGGAAGGGATTCTGAATGGC	57
PKC $\epsilon$ rev	407	CGTACATCAGCACGCCCAGG	57
PKC $\eta$ for	408	GCAGGATGACGATGTGGAATGC	61
PKC $\eta$ rev	409	GGTCACCTCCGTTCAAACTCC	61
PKC $\iota$ for	412	GAGCCTTCCATCTCCTTTGAAGG	62
PKC $\iota$ rev	413	GCCTCTTCCAACCTCCAACCTGAGAAG	62
PKC $\theta$ for	418	GGGACGCCTGACTACATCGCTC	60
PKC $\theta$ rev	419	CCGTGGAAAGGCGACTGGC	60
PKC $\mu$ for	414	GGAGGGCGATCTTATTGAAGTGG	60
PKC $\mu$ rev	415	CCAGTCCCCACAGCATTCTCC	60
PKC $\nu$ for	416	GTCAAATGTGTCTCTGCCAGGACC	58
PKC $\nu$ rev	417	GGACGACCACTCCAGGACGG	58
PKC $\zeta$ for	420	GCCTTCTTCCGAAGCATAGACTGG	60
PKC $\zeta$ rev	421	GGGCTCGCTGGTGAACCTGC	60
PLC $\beta$ 1 for		AGAGGAAGTCAAGAAGGAGGCTGACC	60
PLC $\beta$ 1 rev		GTGCAAGGGTTGCGGTGTGATT	60
PLC $\beta$ 2 for		TTTCCTGCCGATCGCAAACG	60
PLC $\beta$ 2 rev		GCTCTTGTACACAGATTCTGGGAAGTCC	60
PLC $\beta$ 3 for		ACCACCGATGAGGGCACAGC	60
PLC $\beta$ 3 rev		TTCGAGCAGCCTCAAAGGACTTG	60
PLC $\beta$ 4 for		GGCTTCACTTACATGGTGGCTGAAA	60
PLC $\beta$ 4 rev		ATCGGACTGACGTTGTTTGCCCT	60
PLC $\gamma$ 1 for		CCCCTGCAAATTGAGAGATGGC	60
PLC $\gamma$ 1 rev		CCCGGTAGTTGACCTGTGACAGC	60
PLC $\gamma$ 2 for		ACCCCAACTTCCTGGCTCATGC	60
PLC $\gamma$ 2 rev		ACGCCAGCTCGATGTCTTCACTGT	60

PLC $\delta$ 3 for	TCCGATAGCAGCACCAAAAGGC	60
PLC $\delta$ 3 rev	TGCGTGAGCGGATCTTGAGGA	60
PLC $\epsilon$ for	TCACTGCCCCGTCTCAAAGCA	60
PLC $\epsilon$ rev	CATGTTACCCAGGAGCTCACCTCG	60
PLC $\zeta$ for	TTGGGGATATATAAGTGCCCTCGTGA	60
PLC $\zeta$ rev	AAGAGAAGCTTGCTGGTGAGAGTGTAGC	60

### 3.9 Zellbiologische Methoden

#### 3.9.1 Kultivierung von adhärenenten eukaryontischen Zellen

HeLa-, HEK- und COS-Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) in DMEM, supplementiert mit 5 % fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert und regelmäßig bei Konfluenz passagiert. Zur Zellpassage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Trypsinieren aus den Zellkulturflaschen gelöst und ein Teil davon in frischem Medium resuspendiert und weiter verwendet.

#### 3.9.2 Transfektion eukaryontischer Zellen

Durch Transfektion ist es möglich Plasmid-DNS in Zellen einzubringen. Sofern ein geeigneter Promotor vorgeschaltet ist, exprimieren die transfizierten Zellen das gewünschte Gen auf dem Plasmid. Die in dieser Arbeit zur Transfektion verwendeten Plasmide besitzen alle einen CMV-Promotor vor dem eingebrachten Gen. Transfektionen wurden mit dem NanoJuice™ Transfection Kit (Merck, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Transfektionsreagenz wird eine Kombination aus Dendrimeren und polykationischen Lipiden



verwendet, was eine maximale Transfektionseffizienz bei minimaler Zytotoxizität gewährleisten soll.

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Standardmäßig enthielten die Transfektionsansätze gleiche Volumina Transfektionsreagenz und Booster. Die Expression von Fusionsproteinen wurde ein bis zwei Tage nach der Transfektion fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

### **3.9.3 Transduktion von primären Zellen**

Ausdifferenzierte Zellen wie Kardiomyozyten lassen sich mit chemischen Methoden nur mit sehr geringer Effizienz transfizieren. Um fremde Gene in diese Zellen einzubringen, werden virale Vektoren als Hilfsmittel eingesetzt. Bei dieser Technik ist besonders wichtig, dass die Viren nicht in der Lage sind, sich zu replizieren, und dass es unter keinen Umständen zur Rekombination zu wildtyp- (wt) Viren kommen kann. Dazu stehen verschiedene Virussysteme zur Verfügung. Neben den hier verwendeten adenoviralen Vektoren, werden zum Beispiel noch adeno-assoziierte Viren oder Lentiviren als Vektoren eingesetzt.

Um Gene in adulte Ratten-Kardiomyozyten einzuschleusen, wurden replikationsinkompetente Adenoviren verwendet. Diese sind in der Lage Zellen zu infizieren, sodass es zur Expression des eingeschleusten Gens kommt. Aufgrund einer Deletion im Virusgenom können sich die Viren allerdings nicht selbstständig vermehren. Je nach Titer wurden unterschiedliche Volumina der Virusamplifikation zum Zellkulturmedium frisch isolierter Zellen gegeben. Die Expression der Fusionsproteine wurde an Tag 3 fluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Sämtliche Messungen fanden daher an Tag 3 nach Transduktion statt.

### 3.9.4 Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz kann die Verteilung einzelner Proteine in Säugerzellen durch Fluoreszenzmarkierung visualisiert werden. Hierzu werden Antikörper verwendet, die spezifisch die gewünschten Proteine erkennen. Dabei ist es möglich, dass diese Antikörper selbst an ein Fluorochrom gekoppelt sind (direkte Immunfluoreszenz) oder es werden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet (indirekte Immunfluoreszenz). Die Verwendung von Sekundärantikörpern führt zu einer Signalverstärkung, da pro Erstantikörper mehrere Zweitantikörper binden können.

Die auf Deckgläsern ausgesäten Kardiomyozyten wurden kurz mit PBS gewaschen und mit 4 % (w/v) PFA 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. PFA fixiert die Zellen durch Quervernetzung der Proteine. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 Minuten mit 0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert, um die Zugänglichkeit der Antigene zu gewährleisten. Das Blockieren unspezifischer Bindungen erfolgte mit 5 % (w/v) BSA in PBS für 20 Minuten. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 bis 2 Stunden in einer feuchten Kammer. Diese bestand aus einer Petrischale mit feuchtem Filterpapier. Die Deckgläser wurden auf Parafilm über dem Filterpapier gelegt und 50 µl Antikörperlösung direkt auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:400 in PBS) für eine Stunde ebenfalls in einer feuchten Kammer an. Da dieser das Fluorophor enthält, wurden alle Schritte ab hier im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden. Die Zellen wurden erneut dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen und kurz in Aqua dest. getaucht, um der Bildung von Salzkristallen vorzubeugen. Die Zellen wurden mit einem Tropfen ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) auf beschrifteten Objektträgern eingedeckt. Dadurch waren die Zellen konserviert und das Antifade Reagenz verhinderte ein schnelles Ausbleichen der Fluorophore. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet und im Dunkeln aufbewahrt.

**Tabelle 13: Für Immunfluoreszenz verwendete Antikörper**

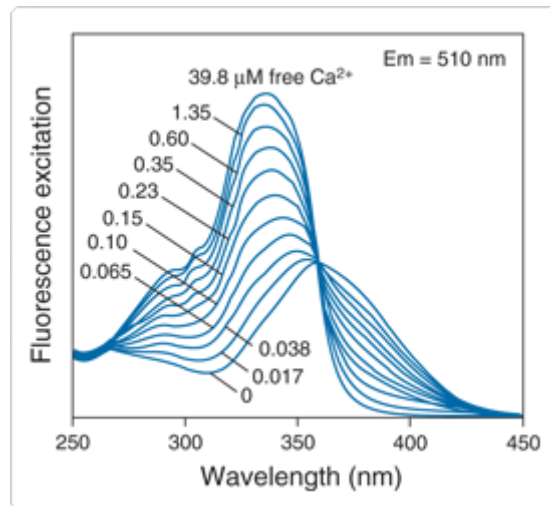
Primärantikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
Maus Anti-PKC <sub>1</sub>	23/PKC <sub>1</sub>	1:25	BD Biosciences
Maus Anti- $\alpha$ -Actinin	EA-53	1:400	Sigma
Sekundärantikörper		Verdünnung	Hersteller
Ziege Anti-Maus IgG-Cy2		1:400	Jackson Immuno Research
Ziege Anti-Maus IgG-DyLight 649		1:400	Jackson Immuno Research

### 3.9.5 Kalziummessungen mit Fura-2

Fura-2 ist ein ratiometrischer Kalziumindikator und wird standardmäßig für quantitative intrazelluläre Kalziummessungen verwendet. Der Absorptionspeak von Fura-2 verschiebt sich von 340 nm im kalziumgebundenen Zustand zu 380 nm im kalziumfreien Zustand. Der Fluoreszenzpeak liegt für beide Anregungswellenlängen bei 510 nm. Nach vorheriger Kalibrierung kann mit Hilfe des Verhältnisses 340/380 die intrazelluläre Kalziumkonzentration berechnet werden.

Fura-2 wurde als Azetoxymethyl- (AM) Ester verwendet. AM-Farbstoffe sind hydrophob genug, die Zellmembran zu passieren und sind in der Lage durch einfache Zugabe zum extrazellulären Medium in die Zellen einzudringen. Hydrophile Farbstoffe können so leicht in jede gewünschte Zelle eingebracht werden. Innerhalb der Zelle kommt es zur Spaltung des AM-Esters durch intrazelluläre Esterasen, wodurch der Farbstoff in der Zelle gefangen ist.

Zum Herstellen einer 1 mM Stammlösung wurden 50 µg Fura-2, AM in 50 µl 20 % (w/v) Pluronic F-127 in DMSO gelöst. Eine Lagerung der Stammlösung war bei -20 °C für mehrere Wochen möglich. Die Herstellung einer 1 µM Arbeitslösung erfolgte an jedem Versuchstag frisch durch 1:1000 Verdünnung in Tyrode.

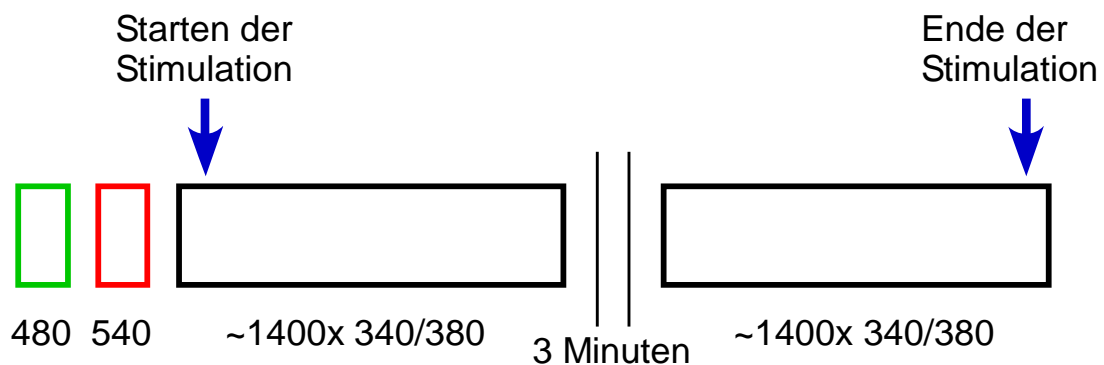


**Abbildung 14: Anregungsspektren von Fura-2 bei unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen.** Nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  kommt es zu einer Verschiebung der Absorptionswellenlänge, was durch Scannen des Anregungsspektrums zwischen 300 und 400 nm beobachtet werden kann, während die Emission bei 510 nm aufgezeichnet wird. (<http://www.invitrogen.com>)

Fura-2 Messungen dienten der Untersuchung, ob die  $\text{PKC}_\alpha$  einen Einfluss auf die Erregungs-Kontraktions-Kopplung von ventrikulären Kardiomyozyten hat. Ratten-Kardiomyozyten, die verschiedene GFP-markierte  $\text{PKC}_\alpha$ -Varianten oder Gelb-fluoreszierendes Protein (YFP) als Kontrolle überexprimierten, wurden an Tag 3 nach Isolation für die Kalziummessungen verwendet. Die Deckgläser mit den Zellen wurden in eine Messkammer eingespannt. Die Beladung der Zellen mit  $1 \mu\text{M}$  Fura-2 erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die anschließende Deesterifizierung in Tyrode dauerte 20 Minuten. Um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Messungen anschließend bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Diese Experimente fanden am Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE2000-U, Nikon, Japan) statt, die Detektion erfolgte mit einer CCD-Kamera (Imago-QE, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing). Ein Monochromator (Polychrome IV, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) generierte die gewünschten Anregungswellenlängen, die von einem dichroischen Spiegel reflektiert und mit einem 20x Ölobjektiv (CFI Plan Fluor, Nikon, Japan) auf die Zellen fokussiert wurden. Kamera und Monochromator wurden von einer Imaging Kontrolleinheit (ICU, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) gesteuert. Diese war an einen Computer

angeschlossen und wurde über die entsprechende Software TILLvisION v4.0 bedient.

Zunächst wurde ein Bild bei 480 nm aufgenommen, um transfizierte Zellen von untransfizierten unterscheiden zu können, und um später die Signale auf die Expressionsniveaus der Protein Kinasen normieren zu können. Ein Bild bei 540 nm sollte dazu dienen, die Fluoreszenz der Zellen bei 480 nm auf die Autofluoreszenz der Zelle zu normieren. Das anschließend gestartete Protokoll sah ein ständiges Wechseln der Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm vor, wobei 40 Sekunden lang pro Wellenlänge etwa 35 Aufnahmen pro Sekunde entstanden. Nach wenigen Sekunden wurde mit der elektrischen Stimulation der Zellen bei 3 Hz begonnen. Im Anschluss folgte eine Phase von 3 Minuten ohne Aufzeichnung von Signalen. In dieser Zeit gingen die Zellen in den “Steady State” über, welcher anschließend in einer erneuten Sequenz von 40 mal 35 Bildern bei beiden Anregungswellenlängen detektiert wurde. Damit es an den Elektroden nicht zur Elektrolyse kommt, war die permanente Zuführung von Tyrode über eine Perfusion notwendig.



**Abbildung 15: Aufbau des Protokolls zur Messung von Fura-2 Signalen.** Zuerst wird jeweils ein Bild bei 480 nm und 540 nm aufgenommen. Anschließend werden abwechselnd bei 340 nm und 380 nm 40 Sekunden lang je 35 Bilder pro Sekunde gemacht. Nach einer Pause von 3 Minuten folgt erneut die Sequenz mit je 35 Bildern pro Sekunde bei beiden Wellenlängen.

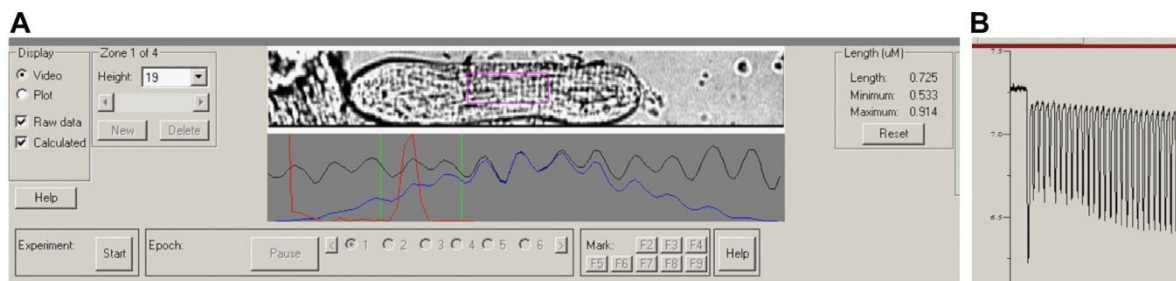
Die Experimente wurden ohne vorherige Kalibrierung durchgeführt. Daher war es nur möglich qualitative Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration zu erfassen. Anhand der Fluoreszenzsignale bei 340 nm und 380 nm erfolgte die Berechnung der Kalziumtransienten einzelner Kardiomyozyten. Definierte Bereiche im aufgezeichneten Bild („region of interest“ - ROI) wurden ausgewählt, um die zu analysierenden Zellen gelegt und einzeln analysiert. Aus diesen Signalen wurden anschließend die Post Rest Amplitude, die „Steady State“ Amplitude, sowie die Dauer der Kalziumtransienten („calcium transient duration“ - CTD) ermittelt.

### 3.9.6 Sarkomerlängenmessungen

Zur Charakterisierung der Kontraktion wurden Sarkomerlängenmessungen von isolierten Kardiomyozyten bei elektrischer Stimulation durchgeführt. Die Messungen wurden an Tag 3 nach Isolation und Transduktion mit den PKC $\iota$ -GFP-beziehungsweise YFP- Viren durchgeführt, um zu analysieren, ob die PKC $\iota$  einen Effekt auf die Kontraktion der Herzmuskelzellen ausübt. Die Messungen erfolgten bei 37 °C und einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz, um möglichst physiologische Bedingungen zu generieren und die Ergebnisse mit den Kalziummessungen vergleichen zu können. Diese Experimente fanden am Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE2000-U, Nikon, Japan) mit einem 40x Ölobjektiv (Plan Fluor, Nikon, Japan) statt. Die Sarkomerlängenänderung während der Kontraktion wurde mit einer schnellen Kamera (Aufzeichnungsfrequenz 240 Hz, MyoCam, IonOptix Corp., USA) detektiert und über die Software IonWizard (IonOptix Corp., USA) aufgezeichnet. Das System speichert die Sarkomerlängenänderungen, welche in Igor Pro (WaveMetrics Inc., USA) weiter verarbeitet werden können. Die Makros hierzu wurden von Qinghai Tian programmiert.

Es wurde zunächst im Fluoreszenzlicht überprüft, ob die Zellen die gewünschte Expression der eingeschleusten Fusionsproteine bzw. YFP zeigten, also eine deutlich erkennbare Fluoreszenz aufwiesen. Anschließend wurde die Kamera so gedreht, dass die zu analysierende Zelle horizontal in dem in Abbildung 16 A abgebildeten Fenster lag. Der Kontrast und die Helligkeit waren so einzustellen, dass die Querstreifung der Zelle deutlich und regelmäßig zu erkennen war. Das

rosafarbene Rechteck definiert den Bereich der Zelle, in dem die Messung der Sarkomerlängen während der Kontraktion stattfand. Die schwarze Linie im Fenster darunter gibt die Regelmäßigkeit der Querstreifung in diesem Bereich wieder, welche für diese Experimente essenziell ist.



**Abbildung 16: Positionierung der Zelle und Messung der Sarkomerlängen.** **A** Für die Sarkomerlängenmessungen muss die Zelle so positioniert sein, dass mit Hilfe des rosafarbenen Rechteckes Bereiche identifiziert werden können, die eine deutliche Querstreifung zeigen, sodass die schwarze Linie die Form einer regelmäßigen Schlangenlinie aufweist. Die rote Linie gibt die Fourier-Transformation wieder und sollte in dem durch die grünen Linien eingegrenzten Bereich nur einen Peak zeigen, der den durchschnittlichen Sarkomerabstand repräsentiert. **B** Aufzeichnung der Sarkomerlängen während der Kontraktion.

Kurz nach Starten der Messung wurde mit der elektrischen Stimulation begonnen. Die Aufzeichnung (Abbildung 16 B) erfolgte über 30 Sekunden. Darauf folgte eine Phase von 4 Minuten, in der die Zellen den „Steady State“-Zustand erreichten. Anschließend folgte erneut eine Phase von 30 Sekunden zur Aufzeichnung der Kontraktionen im „Steady State“.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die Sarkomerlängen bei der ersten Kontraktion, sowie im „Steady State“ analysiert.

### 3.10 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.10.1 Proteinpräparation aus eukaryontischen Zellen

Adhärenente Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, bei 250 x g pelletiert und das Pellet in PKC-Extraktionspuffer aufgenommen. Dieser Puffer enthielt das Detergenz Triton X-100 und bewirkte die Zelllyse, wobei es zum Entlassen der löslichen Proteine aus der Zelle kam. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer und DNS erfolgte für 10 Minuten bei 18000 x g und 4 °C. Der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthielt, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Konzentrationsbestimmung verwendet.

#### 3.10.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde mit der Bradford Methode gemessen. Diese Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250 von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung an basische Aminosäurereste von Proteinen. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Messung wurden 500 µl Bradford Reagenz, 499 µl Wasser und 1 µl Probe gemischt und die Extinktion bei 595 nm im Photometer bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer zuvor aufgenommenen Standardreihe.

#### 3.10.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen allein aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Durch Zugabe des SDS-Ladepuffers wird das anionische Detergenz SDS im Überschuss zur Proteinprobe gegeben, die anschließend für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert wird. Hierbei kommt es zur effektiven Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen, wobei das SDS an die Hauptkette bindet und mit seinen negativen



Ladungen die Eigenladung der Proteine überdeckt. Dies führt dazu, dass das Ladung/Masse-Verhältnis der Proteine das Laufverhalten nicht mehr beeinflusst, da durch die Zugabe von SDS Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Für eine anschließende Immunoblot-Analyse wurden zwischen 10 µg und 50 µg Proteinextrakt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Standardmäßig wurden 0,75 mm dicke Gele (Mini Protean® Tetra System, Biorad, München) mit 10 % (v/v) Acrylamid-bis im Trenngel und 5 % (v/v) im Sammelgel eingesetzt.

### Gelzusammensetzung (Menge für 2 Minigele)

<u>Trenngel 10 %</u>	<u>Sammelgel 5 %</u>
4,8 ml Wasser	1,8 ml Wasser
2,6 ml Trenngelpuffer	340 µl Sammelgelpuffer
2,5 ml Acrylamid-Bis 40 %	315 µl Acrylamid-Bis 40 %
100 µl APS (10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O)	25 µl APS (10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O)
4 µl Temed	2,5 µl Temed

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 bis 120 V in SDS-Laufpuffer. Zur Größenabschätzung bestimmter Proteinbanden wurden 3 µl des Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad, München) und 3 µl des Roti®-Mark WESTERN-Marker (Roth, Karlsruhe) aufgetragen.

### **3.10.4 Immunoblot-Analyse (Western Blot)**

Beim Western Blot kommt es durch Anlegen eines elektrischen Feldes zum Transfer der durch SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran, wo sie dauerhaft immobilisiert sind. Bei dem verwendeten Mini-Protean® Tetra System (Biorad, München) wird ein Sandwich zusammengesetzt, in dem die Membran auf dem Gel aufliegt und sich beides zwischen Filterpapieren und Schwämmen in einer Kassette befindet. In dieser Konstruktion sind Gel und

Membran dicht aneinander gepresst, was ein Verrutschen der Membran verhindert. Die Kassette wird in die Blotkammer eingesetzt und diese mit Blotpuffer aufgefüllt. Die für etwa 100 kDa große Proteine ausgetesteten Blotbedingungen betrugen 1,5 Stunden bei 400 mA und 4 °C oder über Nacht bei 140 mA und Raumtemperatur. Zur Überprüfung der gleichmäßigen und luftblasenfreien Übertragung der Proteine wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S bindet unspezifisch an alle Proteine, was ein rotes Bandenmuster auf der Membran erkennen lässt und kann anschließend durch PBST wieder entfernt werden.

### **3.10.4.1 Blockieren unspezifischer Bindungen**

Um später eine spezifische Detektion einzelner Proteine erreichen zu können, wurde die Membran nach dem Blotten eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blockierpuffer inkubiert. Hierbei kommt es zur Absättigung der Membran mit den Milchproteinen im Puffer, was unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindert, da unspezifische Bindungsstellen abgedeckt sind.

### **3.10.4.2 Detektion spezifischer Proteine**

Die Detektion bestimmter Proteine auf der Membran erfolgt mittels spezifischer Antikörper gegen die gewünschten Proteine. Diese Primärantikörper binden spezifisch an ihr Antigen auf der Membran, während nicht gebundene Antikörpermoleküle anschließend abgewaschen werden. Ein Sekundärantikörper, der an die Primärantikörper bindet, führt zur Signalverstärkung und ist mit der Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Diese Peroxidase ist in der Lage, das Substrat Luminol umzusetzen, was zur Emission von Licht an den Stellen der Membran führt, an denen die Antikörper gebunden sind. Der für den Primärantikörper passende Sekundärantikörper wurde zusätzlich mit dem Roti<sup>®</sup>-Mark WESTERN-HRP-Konjugat (Roth, Karlsruhe) gemischt, welches an die Markerbanden des Roti<sup>®</sup>-Mark WESTERN-Marker bindet und zu deren Lumines-

zenz führt. Dadurch ist die Detektion des Größenstandards gleichzeitig mit den Proteinbanden möglich.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C. Die Membran wurde anschließend dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen, worauf sich die Inkubation mit dem geeigneten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur anschloss. Nach erneutem Waschen mit PBST für dreimal 10 Minuten, wurde die Membran nach Herstellerangaben mit „Enhanced Chemiluminescence“- (ECL) Plus-Reagenz (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare) benetzt. Die Detektion erfolgte in der Fuji Film Intelligent Darkbox mit der LAS1000 Kamera.

**Tabelle 14: Für Western Blot verwendete Antikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Maus Anti-PKC $\alpha$	23/PKC $\alpha$	1:1000	BD Biosciences
Maus Anti-GFP	7.1 und 13.1	1:1000	Roche
Ziege Anti-Aktin	I-19	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Sekundärantikörper</b>		<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ziege Anti-Maus IgG-HRP		1:30000	Santa Cruz Biotechnology
Hühner Anti-Ziege IgG-HRP		1:30000	Santa Cruz Biotechnology

### 3.10.4.3 Strippen der Membran

Soll die Membran nach der Detektion bestimmter Proteine weiteren Anwendungen zur Verfügung stehen, ist das Entfernen der fest gebundenen Antikörper durch „Strippen“ von der Membran notwendig. Dadurch wird die Membran von den gebundenen Antikörpern sowie den Milchproteinen befreit, was ein erneutes Blockieren notwendig macht.

Das Strippen erfolgte in 0,01 % (w/v) Natriumazid in PBST bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln. Vor der Inkubation mit dem Blockierpuffer wurde die Membran zwei Mal kurz mit PBST gespült und einmal 10 Minuten gewaschen.

### 3.10.5 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation (IP) ist es möglich spezifische Proteine aus einem Zellextrakt aufzureinigen, indem sie an spezifische Antikörper binden, die wiederum an Sepharose-Kügelchen gebunden sind.

50 µl rekombinante Protein G Sepharose 4B Kügelchen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden zusammen mit 1 ml Extraktionspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 10 µl Antikörper und unterschiedlichen Mengen an Proteinextrakten erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C bei ständigem Überkopf-Rollen. Dabei kam es zur kovalenten Bindung der Antikörper an die Sepharose-Kügelchen und der Antigene an die Antikörper. Durch Zentrifugation bei 3400 x g wurden die Sepharose-Antikörper-Antigen Komplexe sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Die IP wurde dreimal durch Zugabe von 1 ml Extraktionspuffer und erneutem Zentrifugieren gewaschen. Alle Schritte fanden bei 4 °C statt.

Für die anschließende Analyse im SDS-Gel wurde der Überstand komplett abgenommen und 20 µl Extraktionspuffer, sowie 10 µl 6x-Ladepuffer zu dem Präzipitat gegeben und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Dabei kam es zur Auflösung der Bindungen zwischen den Antikörpermolekülen und der Sepharose beziehungsweise den präzipitierten Proteinen. 15 µl des Überstandes wurden auf das Gel aufgetragen, während die Sepharose im Reaktionsgefäß zurück blieb.

Für einen anschließenden Aktivitätstest der präzipitierten Proteine wurde der Überstand komplett abgesaugt und 200 µl Extraktionspuffer zugegeben. Eine Auflösung des Präzipitats war für diese Anwendung nicht möglich, da die Proteine in ihrem nativen Zustand erhalten sein mussten. Eine Trennung des Sepharose-Antikörper-Protein Kinase-Komplexes erfordert denaturierende Bedingungen, was zum Verlust der Aktivität geführt hätte.

### 3.10.6 Protein Kinase-Aktivitätstest

Protein Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, Tyrosin- und Histidinresten in ihren Substratproteinen. Diese Reaktion beinhaltet den Transfer der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP auf die Seitenkette der Aminosäure. Die Kinase-Aktivitätstests wurden nach Hastie *et al.* (2006) durchgeführt. Nach diesem Protokoll resultiert eine Protein Kinase Aktivität im Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  in ein Peptid- oder Proteinsubstrat.

In die Tests wurde 1 mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  eingesetzt. Die spezifische Aktivität des gelieferten  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  war durch Messen der Counts pro Minute (cpm) von 1  $\mu\text{l}$  Lösung im Flüssig-Szintillationszähler zu bestimmen. Durch Versetzen einer 1 mM Stammlösung Na-ATP mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  entstand eine Lösung mit einer spezifischen Aktivität von  $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$  cpm/nmol ATP.

Mittels Protein Kinase-Aktivitätstest wurde die Aktivität der überexprimierten humanen wt-PKC $\alpha$ -GFP, der konstitutiv aktiven PKC $\alpha$ -A129E-GFP Mutante und der dominant negativen PKC $\alpha$ -K283W-GFP Mutante in HEK Zellen bestimmt. Mit einem GFP-Antikörper war das Präzipitieren der Protein Kinasen aus den Zelllysaten transfizierter Zellen möglich, welche dann in die Aktivitätstests eingesetzt werden konnten.

Die zu untersuchenden Kinasen wurden in einer Verdünnung in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt, in der sich die Aktivität der wt-PKC $\alpha$ -GFP in Vorversuchen linear in Abhängigkeit zur Enzymkonzentration verhielt. Zudem war es wichtig die Dauer der Reaktion im linearen Bereich der Zeitabhängigkeit zu wählen.

Die Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  in Kinase Assay Puffer, 100  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Substratpeptid in An- oder Abwesenheit von 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Phosphatidylserin.

Als Substratpeptid diente das optimale Substratpeptid für die PKC $\alpha$  (Nishikawa *et al.*, 1997) RRRRRKGSFRRKA. Dabei fungierte der blau markierte Serinrest als Phosphoakzeptor.

### Reaktionsansatz

10x Puffer	5 µl	5 µl
Aktivator (1 µg/µl Phosphatidylserin)	5 µl	-
Substratpeptid (2 µg/µl)	5 µl	5 µl
1 mM [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP ( $10^5$ - $10^6$ cpm/nmol)	5 µl	5 µl
Wasser	10 µl	15 µl
Probe	20 µl	20 µl

Puffer, Aktivator, Substratpeptid, ATP und Wasser wurden vorgelegt und auf 30 °C aufgewärmt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl Probe gestartet und 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Ein Anschnipsen der Reaktion alle 5 Minuten verhinderte das Absetzen der Sepharose-Kügelchen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Pipettieren von 40 µl der Reaktion auf beschriftete P81-Papierstücke, welche sofort in 75 mM Phosphorsäure inkubiert wurden. Diese Inkubation fand in einem Becherglas mit einem Rührfisch und einem Körbchen aus Plexiglas statt, in welchem die Papierstücke Platz fanden. Beim dreimaligen Waschen der Schnipsel in 75 mM Phosphorsäure für je 5 Minuten war eine ständige Durchmischung durch Rühren auf dem Magnetrührer notwendig. Bei P81-Papier handelt es sich um Ionenaustauscherpapier. Die phosphorylierten Peptide binden daran, während sich ungebundenes ATP beim Waschen löst. Kurze Peptide sollten eine Ladung von mindestens +2 bei pH 1,8 aufweisen, damit die Bindung an das Phosphozellulose Papier erfolgt. Die hohe Anzahl an Argininresten am N-Terminus des Substratpeptids hat eine hohe positive Ladung zur Folge und garantiert damit die Bindung an das Ionenaustauscherpapier.

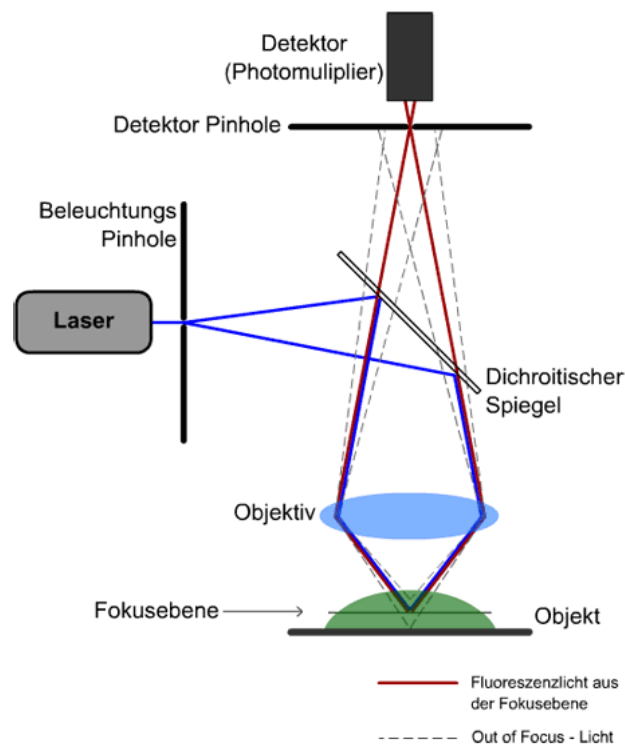
Die Papierstücke wurden mit Aceton gespült, getrocknet und anschließend in Probenröhrchen für den Szintillationszähler gesteckt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssig-Szintillationszähler.

Kontamination durch freies ATP wurde durch eine Kontrolle ausgeschlossen, die das Substrat und ATP enthielt, aber keine Kinase. Eine weitere Kontrolle enthielt ATP und Kinase, aber kein Substrat, wodurch die Inkorporation von Phosphat in die Kinase selbst kontrolliert werden konnte. Als „Nullwert“ diente eine Reaktion

ohne IP, die keine Kinase enthielt. Dieser Wert wurde am Ende von den Messergebnissen der Kinasen abgezogen. Die Messung der Kontrollen sowie der Proben erfolgte in Triplikaten.

### 3.11 Konfokalmikroskopie

Die Lokalisation der Fusionsproteine aus Protein Kinasen und Fluoreszenzproteinen in adulten Kardiomyozyten wurde durch Konfokalmikroskopie untersucht.



**Abbildung 17: Prinzip des Konfokalmikroskops.** Nur Licht aus der Fokusebene wird detektiert, während „out of Focus“-Licht ausgeblendet wird. Laserlicht wird durch einen dichroitischen Spiegel auf die Probe gelenkt. Das Licht aus der Fokusebene gelangt durch eine Lochblende zum Detektor, während das Licht aus anderen Ebenen nicht detektiert wird. (<http://www.univie.ac.at>)

Bei der Konfokalmikroskopie wird das Präparat von einem Lichtpunkt abgetastet und nicht homogen beleuchtet. Eine Blende („pinhole“) ermöglicht, dass nur Licht aus der Fokusebene des Objektivs den Detektor erreicht, während „out of Focus“-Licht ausgeblendet wird, was eine hohe räumliche Auflösung ermöglicht (Abbildung 17).

Die Aufnahmen der subzellulären Lokalisation der Protein Kinasen wurden mit dem Laserscanning Konfokalmikroskop TCS SP5 II (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) gemacht, das einen Hochgeschwindigkeits „Laser scanning head“ besitzt und mit dem die simultane Detektion mehrerer Emissionskanäle mit hoher Effizienz möglich ist. Ein Akusto-optischer Strahlteiler ersetzt hier den primären dichroischen Spiegel, indem er das Anregungs- und das Emissionslicht spaltet und dadurch eine optimierte Detektion ermöglicht. Die Detektion erfolgte mit einem hoch sensitiven Zweikanal Prismenspektrometer. Für die Anregung von GFP wurde ein Argon-Krypton Gaslaser verwendet. Die Anregung von Atto 647 und DyLight 649 erfolgte mit einem Helium-Neon Laser. Die Laserwellenlänge wurde in den AOTF- (Acousto Optic Tunable Filter) Einstellungen festgelegt. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte über die Leica Anwendungssoftware.



### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Genexpressionsanalyse von Kardiomyozyten nach chronischer hormoneller Stimulation mit Endothelin-1 und Phenylephrin

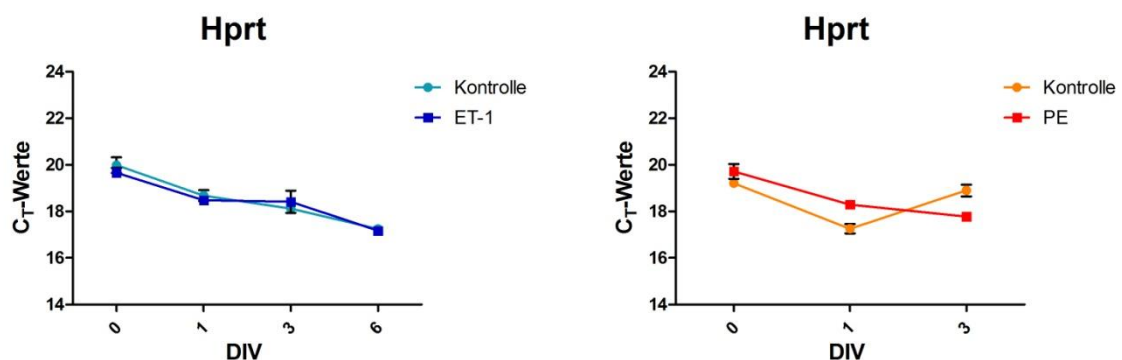
In dieser Studie wurde untersucht, ob die chronische Stimulation adulter Kardiomyozyten der Ratte mit Endothelin-1 und Phenylephrin einen Einfluss auf die Erregungs-Transkriptions-Kopplung ausübt. Es wurde analysiert, ob sich die Hormonzugabe auf die Expressionsniveaus verschiedener Proteinklassen auswirkt. Dabei wurde auf die PKCs, PKDs und PLCs eingegangen, von denen bekannt ist, dass zumindest einige Isozyme an bestimmten Signalwegen beteiligt sind, die zu Krankheitsverläufen wie Hypertrophie und Herzversagen führen. Einige Isoformen dieser Enzymklassen sind zum Beispiel an der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion beteiligt, welche durch die beiden Hormone angeschaltet wird.

Für diese Genexpressionsanalysen wurden adulte Ratten-Kardiomyozyten nach Isolation durch Zugabe von 100  $\mu$ M Phenylephrin oder 100 nM Endothelin-1 zum Medium stimuliert. Um einen zeitlichen Effekt zu erfassen, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. DIV0 bedeutet, dass die Zellen etwa 2 Stunden nach Beginn der Stimulation geerntet wurden. Als weitere Erntezeitpunkte wurden DIV1, DIV3 und DIV6 gewählt.

##### 4.1.1 Auswahl geeigneter Housekeeping-Gene

Zunächst wurden verschiedene Gene auf ihre Tauglichkeit als HK-Gene untersucht. Hierfür wurden Gene ausgesucht, die innerhalb der Arbeitsgruppe oder in anderen Publikationen schon als solche verwendet wurden. Um eine Übertragbarkeit auf Ratten-Kardiomyozyten sicherzustellen, wurden ausgiebige Tests durchgeführt, da auch die Expression von sogenannten HK-Genen je nach Gewebe- oder Zelltyp stark variieren kann (Vandesompele *et al.*, 2002). Unter den

verwendeten Kultivierungsbedingungen und zwischen den unterschiedlichen Behandlungen musste die Expression der HK-Gene stabil sein, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Besonders wichtig war daher auch die Verwendung von Genen, die verschiedenen funktionellen Klassen angehören, da dadurch die Möglichkeit einer Ko-Regulation auf ein Minimum reduziert wurde (Vandesompele *et al.*, 2002). Auf ihre Tauglichkeit als HK-Gene für diese Analyse wurden das saure ribosomale Phosphoprotein P0 (Arbp, NM\_022402), die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase1 (Hprt1, NM\_012583), kardiales alpha-Aktin (Actc1, NM\_019183.1), das ribosomale Protein L10a (Rpl10a, NM\_031065) und Peroxiredoxin-2 (Prdx-2, NM\_017169.1) untersucht. Hierzu wurden Proben aller Bedingungen und aller Zeitpunkte außer PE-behandelte DIV6 Zellen auf die Expression untersucht. Von dieser Bedingung konnten nur sehr geringe RNS-Mengen gewonnen werden, weshalb bei diesem Vorversuch auf diese Bedingung verzichtet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Kultivierungsbedingungen keine signifikanten Unterschiede in den  $C_T$ -Werten hervorriefen, die Expression also unter den Versuchsbedingungen stabil war. Abbildung 18 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für das Gen Hprt.



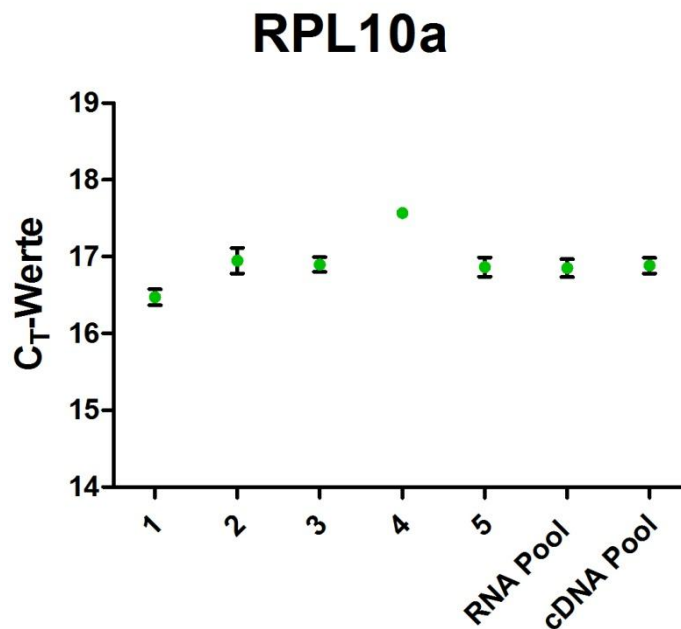
**Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung des Housekeeping-Genes Hprt.** Proben aller Bedingungen mit Ausnahme von PE-behandelten DIV6 Zellen (aufgrund der sehr geringen mRNA-Ausbeute wurde hier auf diese Bedingung verzichtet) wurden für die Analyse geeigneter Housekeeping-Gene verwendet. Die Proben wurden jeweils in Triplikaten gemessen, die gemittelten  $C_T$ -Werte (mit SEM) sind dargestellt.

Um eine hohe Genauigkeit der Normierung zu gewährleisten, ist es üblich sich auf mehr als ein Housekeeping-Gen zu beziehen (Vandesompele *et al.*, 2002). Es wurden für diese Analyse Arbp, Hprt1 und Prdx-2 als Referenzgene ausgesucht, welche nach vorheriger Analyse alle als solche angesehen wurden. Arbp wurde bereits in früheren Analysen der Arbeitsgruppe als Referenzgen bei der Untersuchung humaner Proben verwendet. Prdx-2 wurde von einer anderen Arbeitsgruppe empfohlen und Hprt1 hat sich in einer Studie von Vandesompele *et al.* (2002) über HK-Gene in unterschiedlichen Geweben als sehr stabil erwiesen. Alle Gene werden unterschiedlich reguliert und gehören verschiedenen funktionellen Klassen an.

### **4.1.2 Test auf Varianz in der Genexpression unterschiedlicher Ratten**

Da die mRNS-Ausbeute aus den isolierten Kardiomyozyten relativ gering war, wurde in einem nächsten Schritt getestet, ob Zellen mehrerer Ratten gepoolt werden können. Es wurden jeweils Wistar-Ratten ähnlichen Alters und Gewichts verwendet. Aufgrund des identischen genetischen Hintergrundes wurde erwartet, dass sich die Expression der einzelnen Gene zwischen den Tieren nicht signifikant unterscheidet. Dies wurde anhand einiger ausgewählter Gene untersucht.

Hierzu wurden Kardiomyozyten von 5 Ratten isoliert und jeweils einzeln und gepoolt auf die Expression der 3 exemplarischen Gene Actc1, Hprt1 und Rpl10a untersucht. Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils 10 Messungen gemacht. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden in einem  $\chi^2$ -Test für Randsummen auf Gleichverteilung überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten zwischen den einzelnen Tieren zu beobachten waren. Auch die Einzelmesswerte unterschieden sich nicht zu den Werten, die mit der gepoolten Probe gemessen wurden. Hinsichtlich der drei getesteten Gene gab es zwischen einzelnen Tieren also keine Unterschiede.



**Abbildung 19:  $C_T$ -Werte des Gens Rpl10a von verschiedenen Tieren und gepoolten Proben.** Proben von 5 Ratten, sowie davon gepoolte Proben wurden auf die Expression einiger Gene untersucht um zu überprüfen, ob ein Poolen der Proben von verschiedenen Ratten generell möglich ist. Beispielhaft sind hier die Werte für Rpl10a dargestellt. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung der Original- $C_T$ -Werte von jeweils 10 Messungen für 5 verschiedene Ratten dargestellt, sowie von gepoolten Proben. Es wurden zum einen die RNS-Proben direkt gepoolt und gemeinsam in cDNS umgeschrieben und zum anderen einzeln revers transkribiert und anschließend die cDNS gepoolt.

Abbildung 19 zeigt beispielhaft die  $C_T$ -Werte (Mittelwerte mit SEM) für die 5 verschiedenen Tiere, sowie die Messungen mit den gepoolten Proben für Rpl10a. Hieraus ist ersichtlich, dass zwischen den Individuen kaum Schwankungen in der Expression bestanden und auch die beiden gepoolten Werte auf gleichem Niveau waren. Daraus wurden schon erste Schlüsse gezogen, dass die Genexpression der verschiedenen Tiere so ähnlich war, dass ein Poolen der Proben kein Problem darstellte. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, wurden jeweils alle Messreihen (10 Messungen) gegeneinander in einem  $\chi^2$ -Test für Randsummen gegenübergestellt. Daraus ging hervor, dass die  $C_T$ -Werte jeweils nicht unterschiedlich sowohl zwischen den einzelnen Messungen, als auch zwischen den unterschiedlichen Tieren waren. Es wurden daher zwei wichtige Ergebnisse erzielt. Zum einen waren die Schwankungen zwischen Einzelmessungen sehr

gering, was die Messungen an sich sehr verlässlich machte. Zum anderen wurden ausgehend von diesen Ergebnissen Proben gleicher Bedingungen gepoolt, da hierdurch offenbar keine Informationen verloren gingen oder die Ergebnisse verfälscht wurden.

Aus den für diesen Vorversuch gewählten drei exemplarischen Genen wurde auf gleiche Expressionsniveaus auch für die anderen Gene geschlossen. Es konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Expressionsniveaus bei den einzelnen Tieren nicht signifikant unterschieden. Es war daher möglich, die Proben gleicher Bedingungen zu poolen, was eine höhere Anzahl an zu testenden Genen ermöglichte.

### **4.1.3 Auswahl zu testender Gene und deren Analyse**

Es wurde daher entschieden, die Expression von Isoformen der PKC-, PKD- und PLC-Familien nach chronischer Stimulation mit den beiden Hormonen zu analysieren. Die Familie der PKCs umfasst die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\zeta$ . Bei den PLCs wurden in der Ratte die Isoformen  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\delta 1$ ,  $\delta 3$ ,  $\delta 4$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  identifiziert. Die dafür erforderliche Datenbankanalyse und das Primerdesign für die PLCs wurden von Dr. Sandra Ruppenthal durchgeführt. Des Weiteren wurden die PKD1 (früher auch als PKC $\mu$  bezeichnet) und die PKD3, die auch als PKC $\nu$  bekannt ist, analysiert. Zusätzlich war geplant auch die Expression einiger Rezeptoren zu untersuchen, die an der EC-Kopplung beteiligt sind. Für den Ryanodin-Rezeptor sowie für die IP3-Rezeptoren konnten allerdings trotz mehrerer Tests keine geeigneten Primerpaare gefunden werden. Zum Teil wurden überhaupt keine Signale detektiert, oder aber die Schmelzkurven waren nicht zufriedenstellend. Lediglich für die SERCA-Pumpe konnten auswertbare Ergebnisse erzielt werden, die in die Analyse aufgenommen wurden. Zusätzlich wurde noch das Muskelprotein Nebulette analysiert, das als Markergen für Kardiomyozyten diente. Sollte sich über die Kultivierungsdauer die Zelltypzusammensetzung der Proben geändert haben, könnte dies somit festgestellt werden. Ziel der Analyse war es herauszufinden, ob die ausgewählten

Gene an der zellulären Antwort auf die hormonelle Stimulation mit Endothelin-1 oder Phenylephrin beteiligt sind.

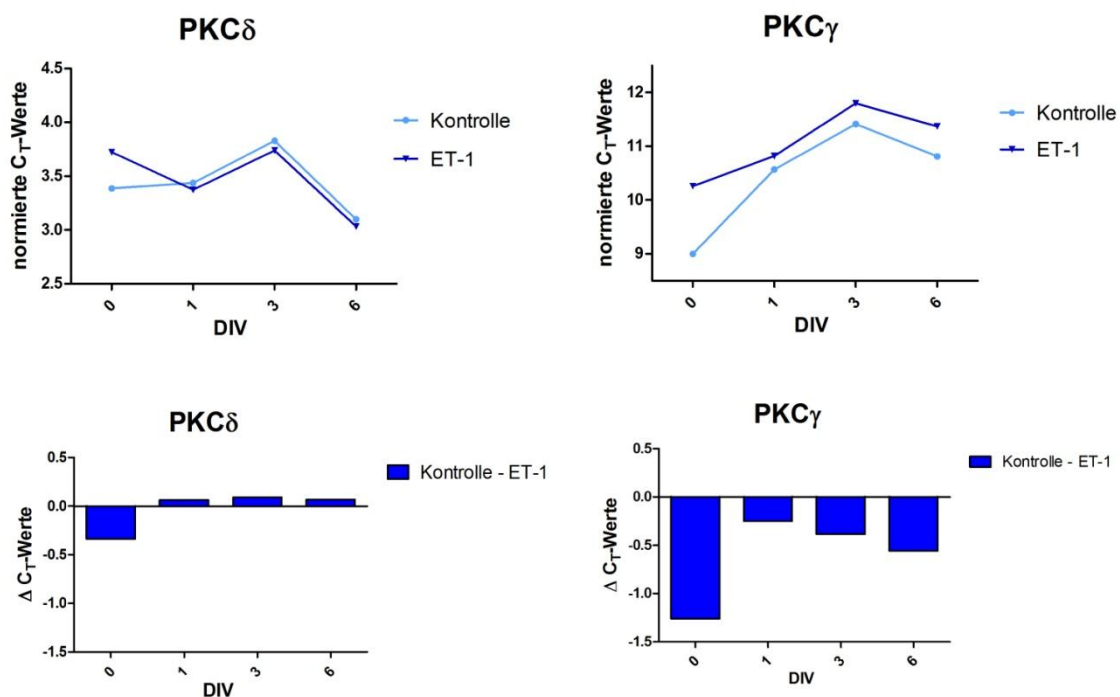
Im Laufe der Experimente fielen einige der zu testenden Gene aus unterschiedlichen Ursachen bereits aus der Analyse. Von einigen Genen konnte kein konsistentes Signal detektiert werden, da die Gene nicht in den Kardiomyozyten exprimiert waren, beziehungsweise die Anzahl der Transkripte wahrscheinlich zu gering war. Dies war zum Beispiel der Fall bei  $PKC_{\alpha}$ ,  $PKC_{\zeta}$ ,  $PKC_{\beta}$ ,  $PKC_{\theta}$ ,  $PKD1$ ,  $PLC_{\delta 1}$ ,  $PLC_{\delta 4}$ ,  $PLC_{\beta 2}$ ,  $PLC_{\gamma 1}$  und  $PLC_{\zeta}$ . Für andere Gene konnten trotz mehrerer getesteter Primer-Paare keine zufriedenstellenden Ergebnisse aus der Analyse der Dissoziationskurven erreicht werden (zum Beispiel RyR). In anderen Fällen gab es während des Prozesses der Analyse unstimmige Ergebnisse, weshalb auch die Gene für die  $PLC_{\beta 3}$  und die  $PLC_{\delta 3}$  aussortiert wurden. Die fertig analysierten Gene sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Die Auswertung erfolgte wie in 3.8.11.6 beschrieben. Die in Igor Pro korrigierten  $C_T$ -Werte wurden auf die Housekeeping-Gene normiert und diese normierten Werte dann auf signifikante Änderungen zwischen Kontrolle und Behandlung analysiert.

An dem in Abbildung 20 dargestellten Beispiel der  $PKC_{\delta}$  und  $PKC_{\gamma}$  lässt sich das Prinzip der angewandten Signifikanztests erklären. Die im oberen Teil der Abbildung gezeigten Messreihen wurden mit einem Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Während für die  $PKC_{\delta}$  die beiden Messreihen keine signifikanten Unterschiede ergaben, wurden für die  $PKC_{\gamma}$  signifikant höhere Werte für die Endothelin-1 behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen. Da höhere  $C_T$ -Werte für eine geringere Anzahl an Transkripten stehen, heißt das, die Endothelin-1 Behandlung führte zu einer signifikant verringerten Transkriptionsrate der  $PKC_{\gamma}$ . Des Weiteren ergab der zusätzliche  $\chi^2$ -Test für die  $PKC_{\delta}$  ebenfalls keine Änderungen. Im Gegensatz dazu wurden für die  $PKC_{\gamma}$  auch hier signifikante Änderungen zwischen Kontrolle und Endothelin-1 Behandlung festgestellt. Bereits die Kontrolle war über die Kultivierungsdauer signifikant verändert, was bedeutet, dass es deutliche Unterschiede zur Annahme der Gleichverteilung gab. In einem anschließenden Test wurde überprüft, ob es

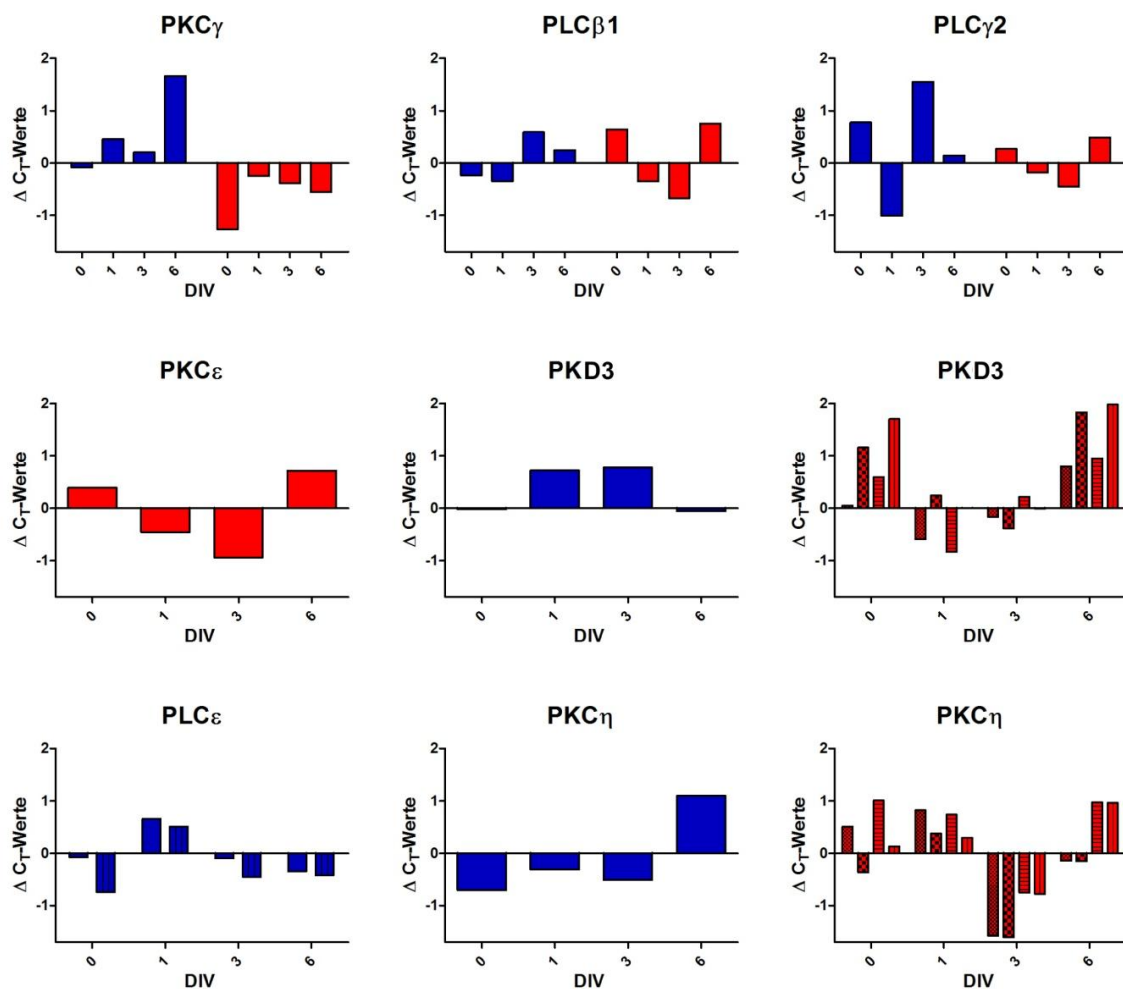
zusätzliche Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlung über die Kultivierungsdauer gab.

Im unteren Teil der Abbildung 20 sind die  $\Delta C_T$ -Werte zwischen Kontrolle und Behandlung dargestellt. Dadurch lassen sich die Änderungen besser erfassen. Es ist hier gut zu erkennen, dass die Unterschiede bei der PKC $\delta$  sehr gering waren, während sie für die PKC $\gamma$  signifikant ausfielen.



**Abbildung 20: Darstellung der Änderungen für PKC $\delta$  und PKC $\gamma$ .** Es wurde beispielhaft je ein Gen ausgesucht, bei dem die ET-1 Behandlung keine signifikanten Änderungen zur Folge hatte (PKC $\delta$ , links) und eines, bei dem sie signifikante Änderungen hervorrief (PKC $\gamma$ , rechts). Oben: Werte für Kontroll- und für ET-1 behandelte Zellen für die beiden ausgewählten Gene. Es sind die auf die drei Housekeeping-Gene normierten  $C_T$ -Werte zu den jeweiligen Erntezeitpunkten (DIV0, 1, 3, 6) abgebildet. Unten:  $\Delta C_T$ -Werte zur Darstellung der Änderung, die durch die Behandlung zustande kam. Es wurde hier zur Berechnung der Unterschiede die Differenz zwischen Kontrolle und Behandlung gewählt, da diese die Richtung der Änderung anzeigt (höhere  $C_T$ -Werte bedeuten eine geringere Expression).

Die Ergebnisse aller analysierten Gene sind in Tabelle 15 dargestellt, wobei signifikante Änderungen in den angewandten Tests jeweils farbig hervorgehoben sind. Für alle Gene mit Unterschieden im  $\chi^2$ -Test zeigt Abbildung 21 in der schon aus Abbildung 20 bekannten Weise die  $\Delta C_T$ -Werte zwischen Kontrolle und jeweiliger Behandlung.



**Abbildung 21: Graphische Darstellung aller Änderungen über die Kultivierungsdauer, die sich aufgrund der ET-1 (blau) oder PE-Behandlung (rot) für die verschiedenen Gene ergaben.** Es sind hier alle Bedingungen erfasst, die in Tabelle 15 gelb markiert sind. Bei den ET-1 behandelten Zellen, die auf die PLC $\epsilon$  untersucht wurden, unterschieden sich die Parallelmessungen, weshalb hier jeweils 2 Werte abgebildet sind. Für PKD3 und PKC $\eta$  waren sowohl die Kontrollmessungen, als auch die PE-Messungen unterschiedlich, hier mussten daher insgesamt 4 Differenzen gebildet werden.



**Tabelle 15: Ergebnisse der Vergleiche zwischen hormonbehandelten Zellen und Kontrollzellen der analysierten Gene.** Unterschiede in der Stärke der Expression wurden mit dem Wilcoxon-Test auf Signifikanz geprüft und sind mit Pfeilen gekennzeichnet: rote Felder: signifikante Abnahme der Expression, grüne Felder: signifikante Zunahme der Expression. Unterschiede in der Charakteristik der Zeitverläufe wurden mit dem Chi<sup>2</sup>-Test geprüft: signifikante Verlaufsunterschiede sind gelb markiert. Alle zufallskritisch nicht bedeutsamen Unterschiede sind grau markiert.

	Expressionsstärkenvergleiche mit Kontrollzellen (Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests)		Verlaufsvergleiche über DIV mit Kontrollzellen (Ergebnisse des Chi <sup>2</sup> Tests)		Treten schon im Zeitverlauf der Kontrollzellen Änderungen im Chi <sup>2</sup> -Test auf
	ET-1	PE	ET-1	PE	
PKC alpha					Nein
PKC delta					Nein
PKC epsilon				≠	Ja
PKC eta			≠	≠	Ja
PKC gamma	↓	↑	≠	≠	Ja
PKC nu			≠	≠	Ja
PLC beta1			≠	≠	Ja
PLC beta4					Ja
PLC epsilon			≠		Ja
PLC gamma2			≠	≠	Ja
Serca		↑			Nein
Nebulette					Nein

Der Vergleich zwischen hormonbehandelten Zellen und Kontrollzellen wurde hinsichtlich zweier Aspekte vorgenommen. Zum einen wurde geprüft, ob sich generell Unterschiede in der Expressionsstärke jenseits zufälliger Schwankungen feststellen ließen. Dazu wurde eine speziell für geringe Stichprobenumfänge geeignete Version des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests verwendet. Dieser Test stellte an das Skalenniveau der Daten relativ geringe Ansprüche, da nur die Ranginformationen verwendet wurden. Er lieferte somit eher konservative Ergebnisse, d.h. die mit diesem Verfahren ermittelten Signifikanzen waren nur an sehr wenige Voraussetzungen auf Seiten der Daten gebunden und traten erst dann auf, wenn wirklich bedeutsame Unterschiede vorhanden waren.

Zum anderen wurden die Gesamtverläufe der Expressionswerte über die Zeitachse der DIV verglichen. Hierfür wurde der  $\chi^2$ -Test mit Randsummen verwendet. Dabei bedeuten signifikante Ergebnisse, dass sich die überprüften Zeitreihen in ihren Verlaufseigenschaften überzufällig unterschieden.

Durch diese sich ergänzenden Analyseverfahren war es möglich, sämtliche Möglichkeiten von Änderungen, die aus der Behandlung mit den beiden Hormonen resultierten, zufallskritisch zu prüfen. Die Resultate sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Es wurde demnach einerseits untersucht, ob sich die Anzahl der Transkripte im Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen insgesamt unterschied. Zusätzlich wurde andererseits analysiert, inwiefern es zu Veränderungen über die Kultivierungsdauer sowohl bei stimulierten als auch bei unstimulierten Zellen kam.

Bei 8 der 12 analysierten Gene wurden überhaupt Veränderungen nach Hormonzugabe detektiert. Lediglich für die  $\text{PKC}\alpha$ ,  $\text{PKC}\delta$ ,  $\text{PLC}\beta 4$  und Nebulette wurden keinerlei Veränderungen gefunden, die aus einer Hormonstimulation resultierten. Die Expression dieser Gene war sehr stabil und wurde weder durch die Kultivierung, noch durch die Hormonzugabe beeinflusst.

Für die meisten der Gene gab es Veränderungen in der Charakteristik der Verläufe über die Kultivierungsdauer. Lediglich bei  $\text{PKC}\alpha$ ,  $\text{PKC}\delta$ ,  $\text{PLC}\beta 4$ , SERCA und Nebulette unterschieden sich die Zeitreihen nur zufällig. Signifikante

Expressionsstärkenunterschiede ergaben sich nur für PKC $\gamma$  und SERCA. Bei der PKC $\gamma$  führte die Behandlung mit ET-1 zu einer systematischen Verringerung der Expression, während die PE-Zugabe eine Erhöhung der PKC $\gamma$ -Expression zur Folge hatte. Die Expression der SERCA-Pumpe wurde durch PE ebenfalls erhöht.

Die Kultivierung an sich hatte schon Änderungen in der Expression der PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$ , PKC $\gamma$ , PKD3, PLC $\beta$ 1, PLC $\beta$ 4, PLC $\epsilon$  und PLC $\gamma$ 2 zur Folge, was in der letzten Spalte von Tabelle 15 aufgeführt ist. Für die PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$ , PKC $\gamma$ , PKD3, PLC $\beta$ 1, und PLC $\gamma$ 2 hatte die PE-Zugabe zusätzliche Verlaufsveränderungen zur Folge. ET-1 beeinflusste dagegen die Expressionsverläufe der PKC $\eta$ , PKC $\gamma$ , PKD3, PLC $\beta$ 1, PLC $\epsilon$  und PLC $\gamma$ 2 (Tabelle 15 und Abbildung 21). Dabei ließ sich kein generelles Muster in den Veränderungen erkennen.

### 4.2 Effekt der PKC $\iota$ auf die Physiologie von Kardiomyozyten

PKCs sind in Herzmuskelzellen an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Dabei gibt es zu einigen Isozymen sehr ausführliche Untersuchungen, während über die PKC $\iota$  keinerlei Daten zur Lokalisation oder Funktion in Kardiomyozyten vorliegen.

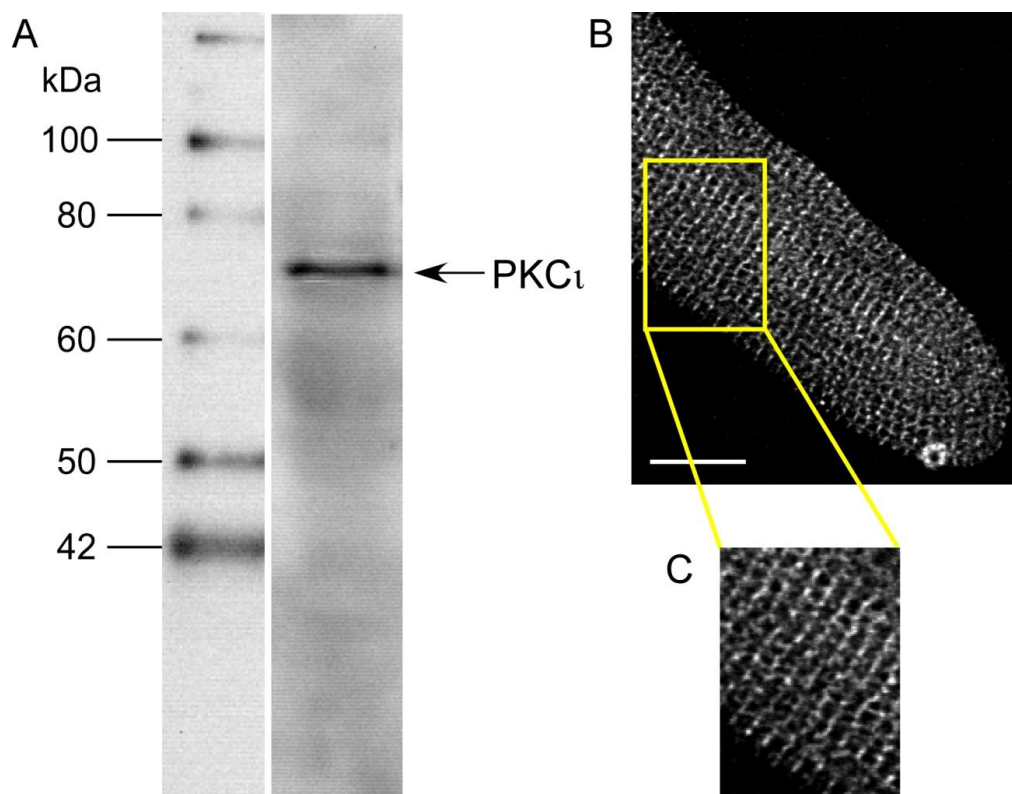
Effekte der PKC $\iota$  auf isolierte Kardiomyozyten der Ratte wurden mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Es wurde hierzu die Expression durch Western Blot-Analyse und die Lokalisation mittels immunzytochemischer Detektion der endogenen PKC $\iota$  in fixierten Zellen, sowie die Lokalisation rekombinanter fluoreszenzproteingekoppelter PKC $\iota$  in lebenden und fixierten Zellen untersucht. Der Einfluss der Protein Kinase auf die physiologische Funktion der Herzmuskelzellen wurde mit Hilfe von Kalzium- und Kontraktionsmessungen analysiert.

#### 4.2.1 Expression und Lokalisation der PKC $\iota$ in Kardiomyozyten der Ratte

Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation der PKC $\iota$  in adulten Herzmuskelzellen der Ratte wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse erfolgte der Nachweis einer endogen exprimierten PKC $\iota$ , deren Lokalisation anschließend mittels Immunzytochemie gezeigt wurde. Für diese Versuche wurde zunächst die Spezifität des verwendeten Antikörpers getestet und bestätigt.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der beiden atypischen PKC Isozyme sind viele der erhältlichen Antikörper nicht in der Lage, spezifisch zwischen PKC $\iota$  und  $\zeta$  zu unterscheiden (Koide *et al.*, 2003; Stross *et al.*, 2009). In einer früheren Studie wurden daher verschiedene Antikörper ausgiebig getestet und die Spezifität des hier verwendeten Antikörpers in den unterschiedlichen Anwendungen eindeutig nachgewiesen (Stross *et al.*, 2009).

In einigen Studien anderer Arbeitsgruppen zur PKC-Expression im Herzen wurde die PKC $\epsilon$  nicht berücksichtigt (zum Beispiel Disatnik *et al.*, 1994). In anderen Untersuchungen fehlt eine Unterscheidung zwischen den diversen Zelltypen die im Herzen vorkommen (z.B. Fryer *et al.*, 1998; Simonis *et al.*, 2007). Durch die unterschiedlichen Funktionen, die zum Beispiel Fibroblasten und Kardiomyozyten im Herzen ausüben, sind auch die Genexpressionsmuster verschieden. Daher kann bei Untersuchungen des Gesamtherzens keine genaue Aussage über die Expression in Kardiomyozyten gemacht werden.



**Abbildung 22: Expression der PKC $\epsilon$  in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Die Expression der PKC $\epsilon$  wurde im Western Blot (A) und durch Immunfluoreszenz (B) nachgewiesen. **A** Im Zelllysate isolierter adulter Kardiomyozyten wurde durch Western Blot-Analyse eine einzelne spezifische Bande auf Höhe der PKC $\epsilon$  (74 kDa) detektiert. **B und C** Durch Immunfluoreszenzfärbung konnte die PKC $\epsilon$  in adulten Kardiomyozyten sichtbar gemacht werden. Die Aufnahmen zeigen die regelmäßige Anordnung des Proteins, wobei eine Querstreifung zu erkennen ist. Der Skalenstrich entspricht 10 µm.

Es war daher zunächst die Frage zu klären, ob die atypische PKC<sub>1</sub> in adulten Herzmuskelzellen der Ratte vorkommt und spezifisch detektiert werden kann. Die Primärstrukturen der beiden atypischen Isoformen der Ratte unterscheiden sich um 19 Aminosäuren, was eine Unterscheidung im Western Blot ermöglicht. Ein Proteinextrakt aus isolierten Kardiomyozyten wurde im Western Blot auf die Expression der PKC<sub>1</sub> analysiert. Der Antikörper erkannte eine Bande bei 74 kDa, was dem Molekulargewicht der PKC<sub>1</sub> entspricht (Abbildung 22 A).

Nachdem so eine spezifische Detektion auf Proteinebene nachgewiesen war, wurde der gleiche Antikörper für immunzytochemische Analysen eingesetzt. Diese zeigten sowohl die Expression, als auch die Lokalisation einer endogen exprimierten PKC<sub>1</sub> in adulten Ratten-Kardiomyozyten (Abbildung 22 B). Aufgrund der Ergebnisse von Stross *et al.* (2009) und der hier im Western Blot bestätigten Spezifität des anti-PKC<sub>1</sub>-Antikörpers, konnte davon ausgegangen werden, dass die Detektion der PKC<sub>1</sub> auch in der Immunfluoreszenzanwendung spezifisch erfolgte.

Durch die Immunfluoreszenzanwendung wurde gezeigt, dass die PKC<sub>1</sub> in Kardiomyozyten eine sehr regelmäßige Anordnung aufwies. Die Verteilung des Proteins in der Zelle ließ ein deutliches Querstreifenmuster erkennen, was die Vermutung nahe legte, dass die PKC<sub>1</sub> mit Bestandteilen des kontraktile Apparates kolokalisierte. Eine Lokalisation an den Z-Scheiben war aufgrund des regelmäßigen Querstreifenmusters sehr wahrscheinlich. Dies ließ den Schluss zu, dass das Protein an der Kontraktion der Muskelzellen, sowie der Erregungs-Kontraktions-Kopplung beteiligt sein könnte.

Das Einbringen eines Fusionsproteins aus PKC<sub>1</sub> und GFP in die Zellen ermöglichte die Untersuchung der Funktion dieser atypischen PKC in Kardiomyozyten. Hierzu wurde ein adenoviraler Vektor hergestellt, der die PKC<sub>1</sub>-GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimierte. Die im Labor entwickelte Isolations- und Kultivierungsmethode (Viero *et al.*, 2008) ermöglicht die Kultivierung adulter Kardiomyozyten der Ratte über mehrere Tage. Dabei bleiben die Struktur und die physiologische Funktion der Muskelzellen größtenteils

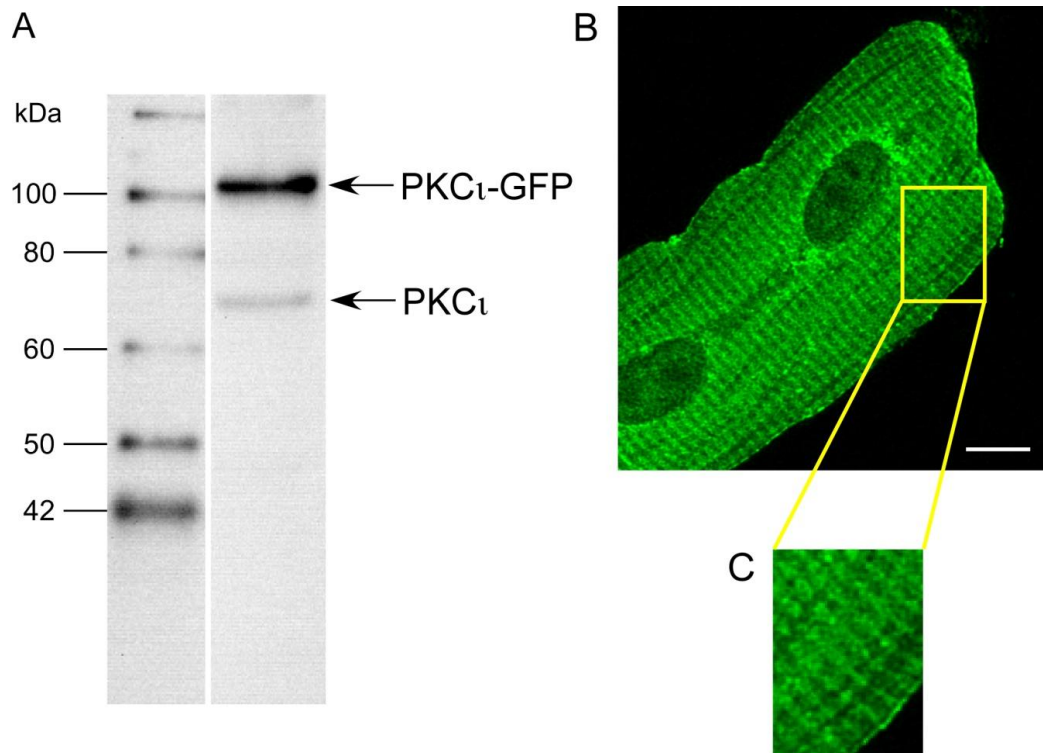
erhalten (Hammer *et al.*, 2010), was das Einschleusen von Genen mittels adenoviraler Gentransfervektoren ermöglicht.

Durch Zugabe der Viruslösung zum Zellkulturmedium frisch isolierter Myozyten kam es zum Eindringen der Viruspartikel in die Zellen und zur Expression des gewünschten Proteins. Durch Verwendung eines Fluoreszenzproteins als Marker konnte die Expression *in vivo* verfolgt werden.

### **4.2.2 Lokalisation der PKC $\alpha$ in Kardiomyozyten nach virusvermitteltem Gentransfer**

Durch virale Gentransfervektoren war es möglich, Gene mit hoher Effektivität in mitotisch nicht mehr aktive Zellen einzubringen. Die Verwendung adenoviraler Vektoren ermöglichte eine hohe Transduktionseffizienz von Kardiomyozyten. Durch Verwendung eines CMV-Promotors wurde eine schnelle Expression des Fusionsproteins erreicht. Da Adenoviren nicht ins Wirtszellgenom integrieren, konnten Nebeneffekte (wie z.B. das Zerstören von Genen) durch Insertion in die genomische DNS ausgeschlossen werden.

Durch die Fusion der PKC $\alpha$  (im Folgenden auch als wildtyp-PKC $\alpha$  bezeichnet) an GFP, konnte die Expression in lebenden Zellen verfolgt werden. Die virusvermittelte Expression wurde im Western Blot, sowie durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Bereits nach 24 Stunden (DIV1) war die Expression der PKC $\alpha$ -GFP auf Proteinebene nachweisbar, was sich in einer zusätzlichen Bande im Western Blot bei etwa 100 kDa ausdrückte (Abbildung 23 A). Dies entsprach dem Molekulargewicht des Fusionsproteins aus PKC $\alpha$  und GFP. Die Fluoreszenz an DIV1 war allerdings nur sehr schwach und dieser Zeitpunkt daher für Versuche nicht geeignet. An DIV3 waren die transduzierten Zellen deutlich an ihrer starken Fluoreszenz zu erkennen und daher leicht von untransduzierten Zellen zu unterscheiden. Für alle weiteren Analysen wurde daher DIV3 als Messzeitpunkt festgelegt.



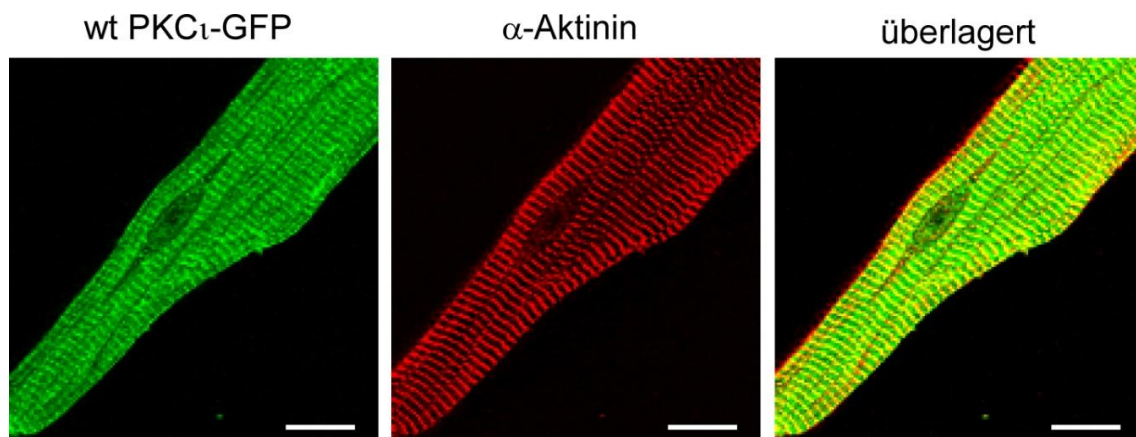
**Abbildung 23: Virusvermittelte Expression eines PKC $\iota$ -GFP Fusionsproteins in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** **A** Im Western Blot wurde das Fusionsprotein im Zellextrakt transduzierter Myozyten (DIV1) bei ca. 100 kDa detektiert, was der Summe der Molekulargewichte der PKC $\iota$  (74 kDa) und GFP (27 kDa) entspricht. **B und C** Die konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahme einer typischen Zelle zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins in Kardiomyozyten (DIV3). Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Fluoreszenzaufnahmen von lebenden und fixierten Zellen bestätigt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigten die Verteilung der wt-PKC $\iota$ -GFP in adulten Kardiomyozyten (Abbildung 23 B). Aus der immunzytochemischen Darstellung ging deutlich eine Querstreifung im Lokalisationsmuster hervor, wie es zuvor in ähnlicher Form für die endogene PKC $\iota$  nachgewiesen wurde. Es konnte daher auch davon ausgegangen werden, dass das Protein korrekt gefaltet in der Zelle vorlag. Zusätzlich zum Querstreifenmuster zeigten die Fluoreszenzbilder der PKC $\iota$ -GFP noch eine Verteilung in Längsrichtung und auch aus den Zellkernen war das Protein nicht vollkommen ausgeschlossen.



Die Querstreifung deutete darauf hin, dass die Kinase an den Z-Scheiben der Myozyten lokalisiert war, was durch Kolokalisationsexperimente mittels Immunzytochemie bestätigt wurde (Abbildung 24).

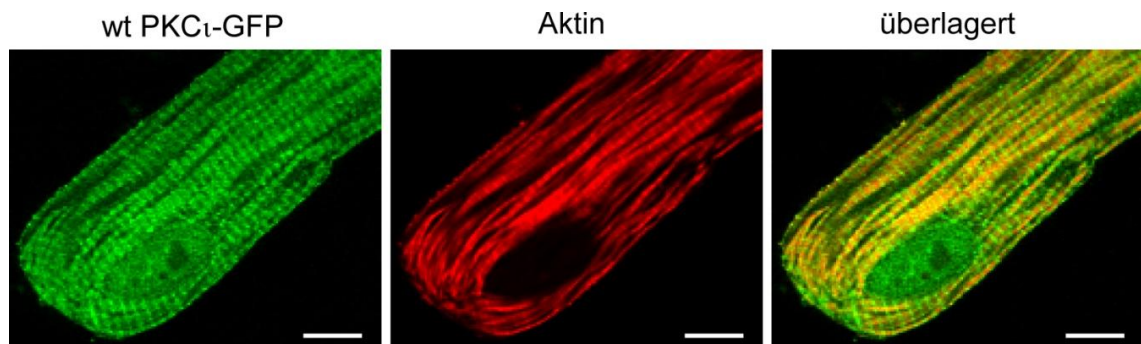
Mit dem PKC $\epsilon$ -GFP Virus transduzierte Zellen wurden an DIV3 fixiert und das Z-Scheiben-Protein  $\alpha$ -Aktinin immunzytochemisch angefärbt. Die Fixierung erfolgte mit Paraformaldehyd, die komplexe Struktur der Herzmuskelzellen blieb bei dieser Methode erhalten. Zur Anfärbung des Zytoskelettproteins wurde ein Sekundärantikörper mit dem Farbstoff DyLight 649 gewählt, da damit keine Überlappung in den Anregungs- und Emissionsspektren mit GFP bestand. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigte eine deutliche Kolokalisation der PKC $\epsilon$  mit  $\alpha$ -Aktinin (gelbe Bereiche in Abbildung 24). Es ist somit sichergestellt, dass das Querstreifenmuster auf eine Lokalisation der PKC an den Z-Scheiben der Kardiomyozyten zurückzuführen war.



**Abbildung 24: Kolokalisation der PKC $\epsilon$ -GFP mit  $\alpha$ -Aktinin in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Zellen wurden an DIV3 mit 4 % PFA fixiert und  $\alpha$ -Aktinin immunzytochemisch nachgewiesen. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigt eine deutliche Kolokalisation beider Proteine. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Um zu untersuchen, ob die zusätzlich entstandene Längsstreifung durch eine Kolokalisation mit Aktinfilamenten zustande kam, wurde von transduzierten Zellen das F-Aktinzytoskelett mit Hilfe von Atto 647N-Phalloidin sichtbar gemacht.

Phalloidin ist ein Toxin, das mit hoher Affinität an fibrilläres Aktin bindet und daher gekoppelt an einen Farbstoff dazu verwendet wurde, um das F-Aktinzytoskelett sichtbar zu machen. Dabei zeigte sich ebenfalls eine deutliche Kolokalisation der PKC $\epsilon$ -GFP mit dem F-Aktin, was an den gelben Bereichen in der Überlagerung beider Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 25 zu sehen ist.



**Abbildung 25: Kolokalisation der PKC $\epsilon$ -GFP mit F-Aktin in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Zellen wurden an DIV3 mit 4 % PFA fixiert und das F-Aktin mit Atto 647N-Phalloidin spezifisch angefärbt. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigt eine deutliche Kolokalisation beider Proteine. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Dass die PKC $\epsilon$  nach ihrer Expression sowohl an den Z-Scheiben, als auch am Aktinzytoskelett lokalisiert war, könnte darauf hinweisen, dass sich hier mögliche Substrate befanden. Es ist allerdings nicht bekannt, zu welchem Anteil die Kinase in der Zelle aktiviert oder inaktiv vorlag und ob die Aktivität überhaupt einen Einfluss auf die Lokalisation hat.

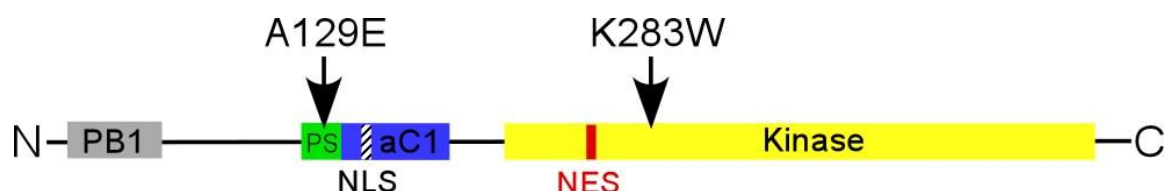
Zur Analyse der Funktion einzelner Proteine in lebenden Zellen ist eine spezifische Aktivierung oder Inhibition des betreffenden Proteins notwendig. Für die atypische PKC $\epsilon$  sind keine spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren verfügbar. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, stellte die Einschleusung einer konstitutiv-aktiven (CA) beziehungsweise dominant-negativen (DN) Variante der atypischen Protein Kinase C dar. Aus diesem Grund wurden diese Mutanten für die PKC $\epsilon$  hergestellt.

## 4.2.3 Herstellung und Funktionalität einer konstitutiv-aktiven sowie einer dominant-negativen PKC $\epsilon$ -GFP Variante

Um die Funktion der PKC $\epsilon$  in Kardiomyozyten besser verstehen zu können, wurden ausgehend von dem wildtyp-Protein durch zielgerichtete Mutagenese zwei Mutantenformen hergestellt. Ein gezielter Aminosäureaustausch in der cDNS führte zur Expression einer CA- bzw. einer DN-Mutante der PKC $\epsilon$  (Abbildung 26).

Um zu untersuchen, inwieweit die Aktivität der PKC $\epsilon$  einen Einfluss auf das Verhalten von Kardiomyozyten hat, wurden wt, CA- und DN-Mutanten der PKC $\epsilon$  in adulte Kardiomyozyten eingeschleust und mögliche Veränderungen im Kalziumhaushalt und im Kontraktionsverhalten der Zellen an DIV3 untersucht.

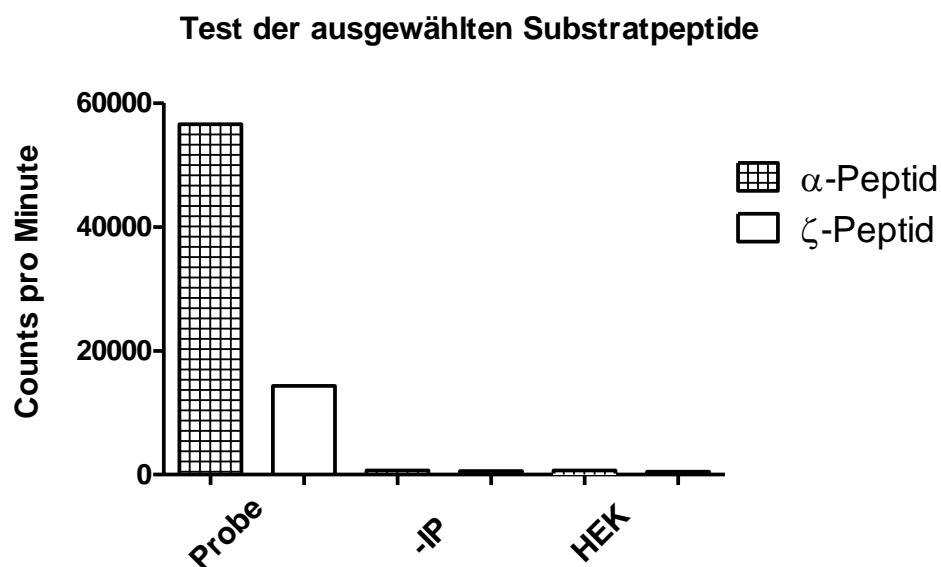
Der Austausch von Lysin (L) 283 durch Tryptophan (W) (K283W), welches sich in der ATP Bindestelle der PKC befindet, führte zur Expression eines dominant-negativen Proteins (Newton AC (ed) Methods in Molecular Biology, 2003). Die Synthese einer konstitutiv-aktiven Form der Kinase wurde durch den Austausch von Alanin (A) 129 durch Glutaminsäure (E) erreicht (A129E). Alanin 129 liegt in der Pseudosubstratsequenz. Das Ersetzen dieses Restes durch einen Glutaminsäurerest führt zum Entlassen des Pseudosubstrates aus der Substratbindestelle, was die Kinase in einen dauerhaft aktiven Zustand versetzt (Newton AC (ed) Methods in Molecular Biology, 2003).



**Abbildung 26: Lage der Mutationen in der Domänenstruktur der PKC $\epsilon$ .** Der Austausch eines Alaninrestes in der Pseudosubstratsequenz (grün) durch einen Glutaminsäurerest verursacht die konstitutiv-aktive Form der Kinase, während das Ersetzen eines Lysins in der ATP-Bindestelle durch ein Tryptophan eine dominant-negative Kinase erzeugt. Es ist zusätzlich die Lage des Kernlokalisierungssignals (NLS) und des Kernexportsignals (NES) dargestellt.

Die funktionellen Effekte der eingefügten Mutationen wurden in einem Kinaseaktivitäts-Assay verifiziert. Hierzu wurden HEK Zellen mit den Expressionsplasmiden für die verschiedenen PKC $\iota$ -GFP Varianten transfiziert und die Proteine extrahiert. Die Aktivitätsmessungen erfolgten nach Immunpräzipitation mit einem anti-GFP Antikörper. Ein Beitrag der endogenen PKC $\iota$  innerhalb der Messung war dadurch ausgeschlossen. Als Maß für die Kinaseaktivität wurde der Einbau von Radioaktivität (aus [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP) in ein Peptidsubstrat unter gegebenen Reaktionsbedingungen in einer definierten Reaktionszeit herangezogen. Die hierfür gewählten Pufferbedingungen nach Hastie *et al.* (2006) sind in 3.10.6 beschrieben.

Da für die PKC $\iota$  kein optimales Peptidsubstrat publiziert ist, wurden zwei verschiedene Peptide auf die effektive Phosphorylierung durch die PKC $\iota$  hin untersucht. Hierzu wurden die optimalen Peptide für die PKC $\alpha$  und PKC $\zeta$  verwendet. Beide Peptide werden sehr effektiv durch die PKC $\zeta$  phosphoryliert (Nishikawa, 1997), welche in ihrer Kinasedomäne und Pseudosubstratsequenz der PKC $\iota$  entspricht.



**Abbildung 27: Test des  $\alpha$ - und  $\zeta$ -Peptids auf Phosphorylierung durch die PKC $\iota$ .** Gleiche Teile einer Immunpräzipitation der PKC $\iota$ -GFP wurden in Duplikaten für die Aktivitätsmessungen mit jeweils 10  $\mu$ g Substratpeptid eingesetzt. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion gestoppt und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler als Counts pro Minute gemessen.

In das für die PKC $\alpha$  optimale Substratpeptid wurde durch die Kinaseaktivität der PKC $\iota$  fast viermal so viel Radioaktivität eingebaut wie in das PKC $\zeta$  Peptid (Abbildung 27). Für alle weiteren Messungen wurde daher das PKC $\alpha$  Substratpeptid (RRRRRKGSFRRKA) verwendet.

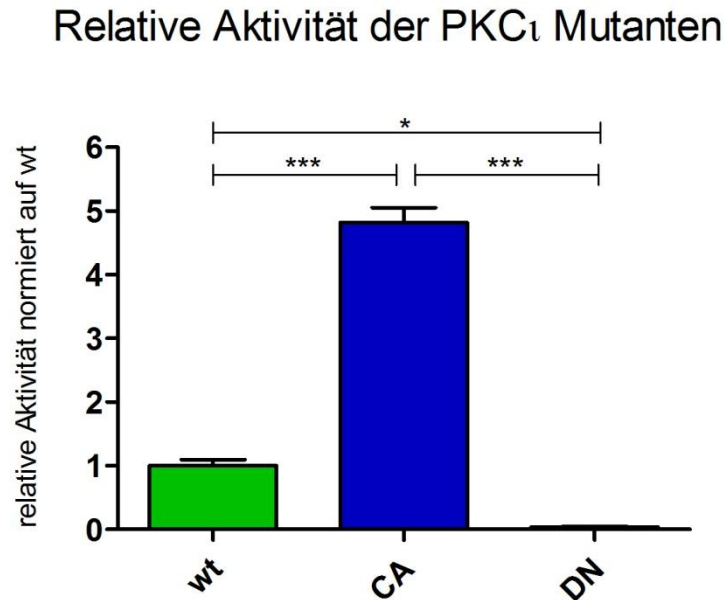
Als Kontrollen wurden die Messungen ohne Zugabe des Immunpräzipitats (-IP), sowie mit IP aus untransfizierten HEK Zellextrakten (HEK) durchgeführt. Beide Proben enthielten kein Enzym, wodurch die Kontamination durch freies ATP berechnet werden konnte. Da kein nennenswerter Unterschied zwischen beiden Kontrollen vorhanden war, wurden für die weiteren Versuche Reaktionen ohne IP als Kontrolle verwendet. Auf die zweite Kontrolle konnte verzichtet werden, da durch die zusätzlichen Inhalte (Sephrose mit Antikörpern) kein unspezifisches Signal entstanden war.

Die Radioaktivität, die durch die Kinase in die Peptide eingebaut wurde, war um zwei Größenordnungen höher als die in den Kontrollen gemessene. Um eine hohe Verlässlichkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sollten die Proben eine 5 bis 10 mal höhere Radioaktivität aufweisen als die Kontrollreaktionen (Hastie, 2006), was hier eindeutig erreicht wurde.

In anschließenden Konzentrations- und Zeitreihen wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die Aktivitätsmessungen bestimmt. Für eine Quantifizierung war die Kinase auf eine Konzentration zu verdünnen, bei der ihre Aktivität linear in Bezug zur Reaktionszeit und Enzymkonzentration war. Obwohl nur relative Änderungen beobachtet werden sollten, war es doch wichtig, dass die Aktivität der Kinase unter den Reaktionsbedingungen nicht im gesättigten Bereich lag. Aufgrund dieser Vorversuche wurden für die Aktivitätstests jeweils ein Zehntel der IP verwendet und eine Reaktionsdauer von 15 Minuten gewählt.

In den finalen Aktivitätstests wurden die Proben jeweils in Triplikaten gemessen, um die Schwankungen zwischen Einzelwerten zu reduzieren. Jeweils gleiche Mengen der einzelnen IPs wurden anschließend im Western Blot auf äquivalente Mengen an präzipitiertem Protein analysiert. Die Bandenintensität wurde in „Image J“ bestimmt und auf die wt-PKC $\iota$  normiert. Die Werte der Aktivitätstests

wurden anschließend an die Proteinmengen angepasst und sind in Abbildung 28 dargestellt.

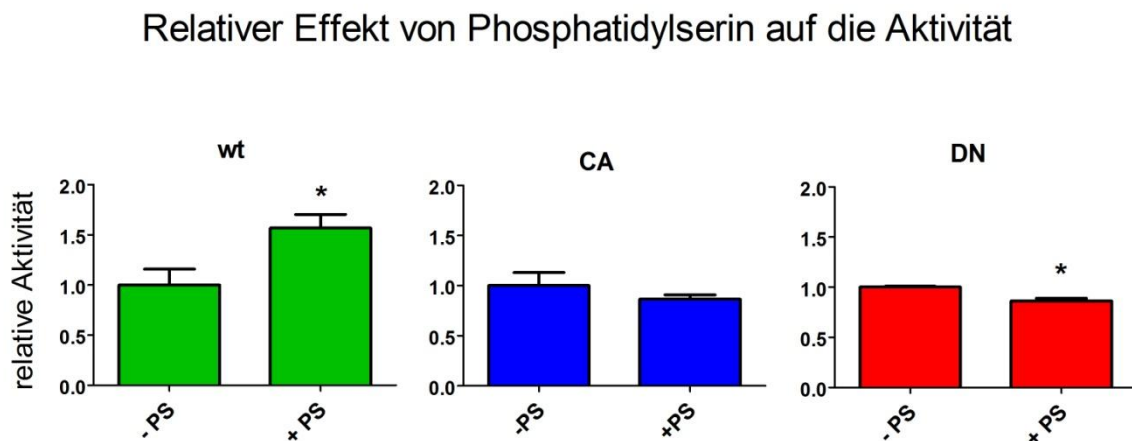


**Abbildung 28: Aktivität der PKC $\alpha$ -Mutanten in HEK Zellen.** Die Aktivität der wildtyp (wt), der konstitutiv-aktiven (CA) und der dominant-negativen (DN) PKC $\alpha$ -Varianten wurde durch Kinase-Aktivitätstests untersucht. Das Maß der Aktivität wurde durch den Einbau von Radioaktivität aus [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP in das PKC $\alpha$ -Substratpeptid berechnet. Die Proteine wurden aus Zellextrakten transfizierter HEK Zellen präzipitiert und in die Messungen eingesetzt. Die Werte wurden auf die präzipitierte Proteinmenge normiert und relativ zum wildtyp-Protein dargestellt. Dem Reaktionspuffer wurde kein Phosphatidylserin als Aktivator für die PKC zugegeben. Es sind die unabhängigen Messungen zweier IPs dargestellt.

Die in HEK Zellen exprimierte PKC $\alpha$ -GFP wies auch ohne Stimulation mit Phosphatidylserin eine basale Kinase Aktivität auf. Die Aktivität der CA-PKC $\alpha$ -GFP in HEK Zellen war fünfmal so hoch, wie die der wildtyp-PKC $\alpha$ . Die dominant-negative Form wies zwar noch eine sehr geringe Restaktivität auf, diese lag aber eine Größenordnung unter der der wildtyp-Kinase und sogar zwei Größenordnungen unter der der CA-Mutante. Die Bestimmung der eingesetzten Proteinmenge war nicht möglich, da in die Messungen die Komplexe aus

Sepharose, Antikörpern und PKC $\iota$  eingesetzt werden mussten. Eine Trennung dieser Komplexe wäre nur unter denaturierenden Bedingungen möglich gewesen. Es wurden daher nicht die spezifischen Aktivitäten berechnet, sondern nur relative Unterschiede herausgestellt.

Die Messungen wurden zusätzlich unter Zugabe von Phosphatidylserin zum Reaktionsgemisch durchgeführt, welches als Aktivator für die PKC $\iota$  diente. Während die Werte der DN-PKC $\iota$ -GFP und der CA-PKC $\iota$ -GFP nach Zugabe von Phosphatidylserin nicht zunahmen, zeigte die wt-PKC $\iota$  wie erwartet erhöhte Werte (Abbildung 29). Die DN-Mutante war nicht durch PS aktivierbar und befand sich in einem permanent inaktiven Zustand. Die CA-Mutante hatte auch ohne Stimulation mit PS dauerhaft maximale Aktivität, die sich durch Zugabe des Aktivators nicht mehr steigern ließ. Dagegen konnte die wt-Variante durch PS aktiviert werden und war nach Stimulation mit 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Phosphatidylserin aktiver als ohne den Aktivator. Dabei erreichte das wt-Protein nicht das Aktivitätslevel der CA-Mutante.



**Abbildung 29: Effekt des Aktivators Phosphatidylserin auf die Aktivität der PKC $\iota$ .** Die Aktivität der immunpräzipitierten wt-, CA- und DN-PKC $\iota$ -Varianten wurde mit und ohne Zugabe des Aktivators Phosphatidylserin (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gemessen und ist jeweils normiert auf die Werte ohne Stimulation dargestellt. Es handelt sich jeweils um Triplikate von einer IP.

Dass die Werte nach Stimulation der CA- und der DN-Variante sogar etwas niedriger waren als ohne Stimulation, lag bei der konstitutiv-aktiven PKC $\iota$  an normalen Schwankungen in den Messungen. Die dominant-negative PKC $\iota$  befand sich fast auf dem Niveau der Kontrollen ohne IP, welche selbst auch deutlichen Schwankungen unterlagen. So war der Wert der Kontrolle ohne Stimulation etwa 300 cpm, derjenige mit Stimulation etwa 600 cpm. Wurden diese als Nullwerte eingesetzt, wirkte sich dies auf die niedrigen Werte der DN-Mutante in hohem Maße aus, während der Einfluss auf die deutlich höheren Werte der beiden anderen Kinasen verschwindend gering ausfiel.

#### **4.2.4 Expression und Lokalisation der PKC $\iota$ -GFP-Mutanten in Kardiomyozyten nach virusvermitteltem Gentransfer**

Ebenso wie von der wildtyp-Kinase, wurde von der konstitutiv-aktiven und der dominant-negativen PKC $\iota$ -GFP-Variante ein Adenovirus hergestellt, um die Proteine in Kardiomyozyten einzuschleusen und deren Lokalisation und Effekte in Lebendzelluntersuchungen charakterisieren zu können. Die Überprüfung der Expression der Fusionsproteine erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. Wie zuvor schon für das wt-Protein gezeigt wurde, war an DIV3 eine deutliche Fluoreszenz der transduzierten Zellen zu erkennen.

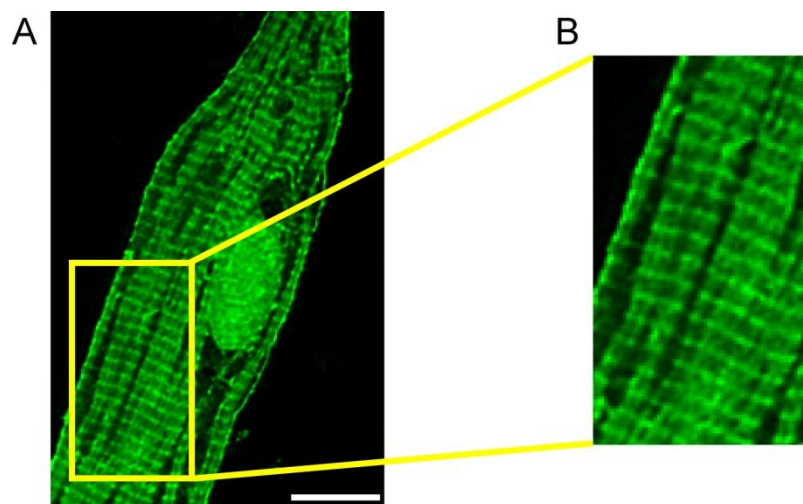
Aufgrund der in den Aktivitätstests nachgewiesenen deutlich unterschiedlichen Aktivitätszustände der einzelnen PKC $\iota$ -Varianten lag die Vermutung nahe, dass es auch bei der Lokalisation in den Kardiomyozyten Unterschiede geben könnte. Die Aktivierung der cPKCs und der nPKCs mit Phorbolestern führt beispielsweise zu deren Translokation zur Zellmembran. Nach Stimulation mit ATP translozieren cPKCs in Kardiomyozyten ebenso zur Plasmamembran, während nPKCs zum ER lokalisieren (persönliche Mitteilung von Xin Hui). Eine Translokation zum Zellkern wurde für die atypische PKC $\zeta$  nach Stimulation mit dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) in PC12 Zellen nachgewiesen (Zhou *et al.*, 1997; Neri *et al.*, 1999). In HEK und Hela Zellen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der PKC $\iota$  von der Aktivität der Kinase abhängig ist (Perander *et al.*, 2001).



Es wurde daher zunächst untersucht, ob die unterschiedlichen PKC $\epsilon$ -Varianten auch eine unterschiedliche Lokalisation in den Herzmuskelzellen aufwiesen. Sollte die Lokalisation der PKC $\epsilon$  in Herzmuskelzellen von der Aktivität der Kinase abhängig sein, müssten deutliche Unterschiede zwischen der Verteilung der konstitutiv-aktiven und der dominant-negativen Variante erkennbar sein. Da die wt-Form aller Voraussicht nach teils aktiv und teils inaktiv vorlag, waren Überschneidungen der beiden Mutanten mit der wt-Variante zu erwarten.

#### 4.2.4.1 Lokalisation der konstitutiv-aktiven PKC $\epsilon$

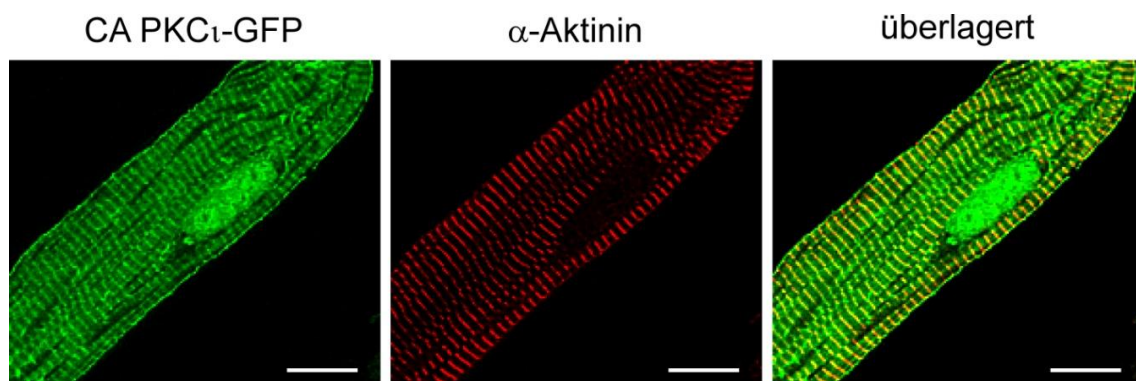
Die Lokalisation der konstitutiv-aktiven Mutante der PKC $\epsilon$  nach adenoviralem Gentransfer in Ratten-Kardiomyozyten ist in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: Virusvermittelte Expression einer konstitutiv-aktiven PKC $\epsilon$ -GFP-Mutante in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Frisch isolierte Kardiomyozyten wurden mit einem Adenovirus transduziert, das zur Expression einer konstitutiv-aktiven PKC $\epsilon$ -GFP Variante (CA-PKC $\epsilon$ -GFP) führte. An DIV3 wurde die Lokalisation durch Konfokalmikroskopie untersucht. Exemplarisch ist ein konfokaler Schnitt durch eine typische Zelle (**A**) sowie eine Detailvergrößerung (**B**) dargestellt. Die Verteilung des Proteins in der Zelle wies sowohl eine Quer- als auch eine Längsstreifung auf. Zudem gab es eine Anreicherung der aktiven Kinase in den beiden Zellkernen, sowie an der Zellmembran der Kardiomyozyten. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Die Verteilung der CA-PKC $\iota$  wies insgesamt sehr viel Ähnlichkeit mit der der wildtyp-Variante auf. Es waren dieselbe Quer- und Längsstreifung zu erkennen, die für die wt-PKC $\iota$  auf eine Lokalisation des Proteins an den Z-Scheiben, sowie am Aktinzytoskelett zurückgeführt werden konnte. Zusätzlich gab es eine Anreicherung der CA-PKC $\iota$  im Zellkern. Das wt-Protein wurde ebenfalls in den Zellkernen der Myozyten nachgewiesen, wobei die Lokalisation der wt-Kinase dort bei weitem nicht so ausgeprägt war, wie die der CA-Mutante. Die PKC $\iota$  besitzt in ihrer Aminosäuresequenz sowohl ein Kernimport-, als auch ein Kernexport-Signal (Abbildung 26), was einen Transport zwischen dem Zytoplasma und den Kernen in beide Richtungen ermöglicht (Perander *et al.*, 2001).

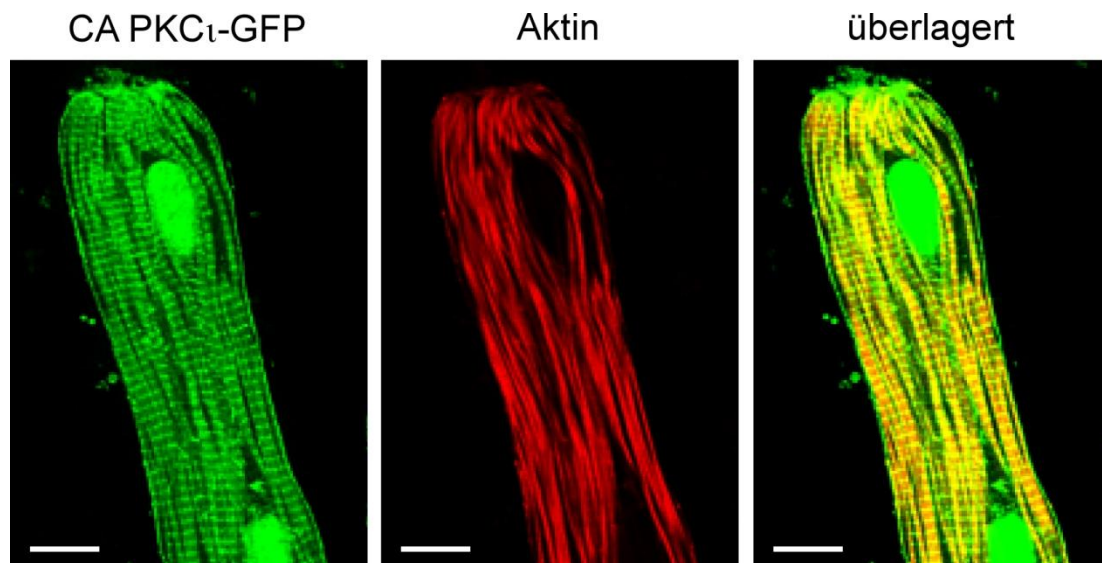
Durch Anfärben von  $\alpha$ -Aktinin in CA-PKC $\iota$ -GFP exprimierenden Myozyten und Überlagern der Fluoreszenzaufnahmen beider Wellenlängen wurde auch für die CA-PKC $\iota$ -GFP eine Kolokalisation (gelbe Bereiche in Abbildung 31) und damit eine Lokalisation an den Z-Scheiben nachgewiesen.



**Abbildung 31: Lokalisation der konstitutiv-aktiven PKC $\iota$ -GFP-Mutante an den Z-Scheiben in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Zellen wurden an Tag 3 nach Isolation und Transduktion mit 4 % PFA fixiert und mit einem anti  $\alpha$ -Aktinin Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigt eine deutliche Kolokalisation beider Proteine. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Das Aktinzytoskelett transduzierter Myozyten wurde mit Atto 647N-Phalloidin sichtbar gemacht und konfokale Schnitte von beiden Wellenlängen aufgenommen. Abbildung 32 zeigt einen Schnitt durch eine typische Zelle. Durch Überlagerung

der Aufnahmen beider Wellenlängen wurde eine Kolokalisation der CA-PKC<sub>1</sub>-GFP mit F-Aktin bestätigt (gelbe Bereiche).

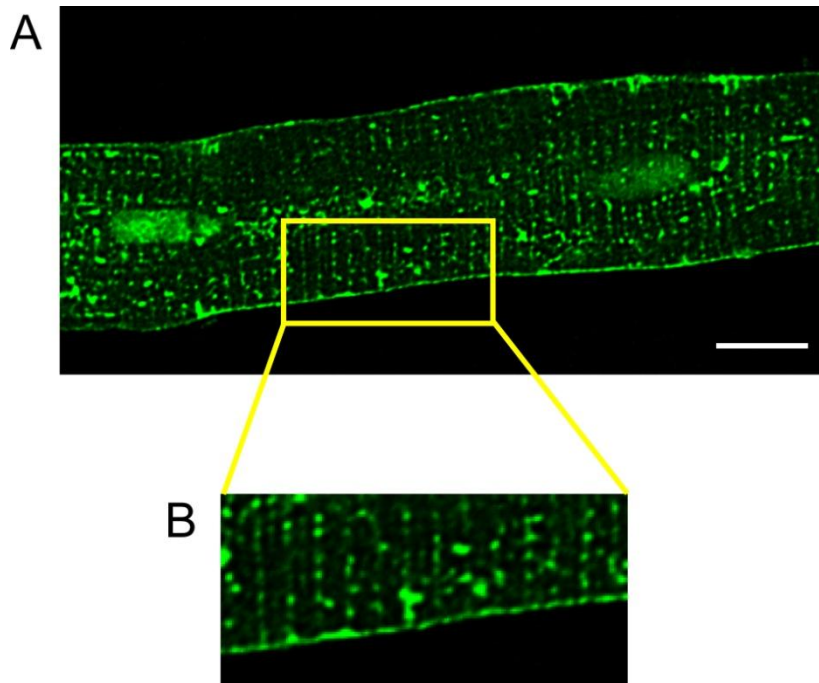


**Abbildung 32: Lokalisation der konstitutiv-aktiven PKC<sub>1</sub>-GFP Mutante am F-Aktinzytoskelett in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Zellen wurden an Tag 3 nach Isolation und Transduktion mit 4 % PFA fixiert und das F-Aktin mit Atto 647N-Phalloidin spezifisch angefärbt. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigt eine deutliche Kolokalisation beider Proteine. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

#### 4.2.4.2 Lokalisation der dominant-negativen PKC<sub>1</sub>

Genauso wie für die beiden vorher gezeigten Varianten, wurde auch für die DN-PKC<sub>1</sub> die Lokalisation in adulten Kardiomyozyten nach adenoviralem Gentransfer analysiert. Abbildung 33 zeigt einen konfokalen Schnitt durch eine typische Zelle.

Die Lokalisation der DN-Mutante unterschied sich sehr deutlich von der der beiden anderen Varianten. Während eine sehr ähnliche Verteilung der wt- und der CA-Kinase festgestellt wurde, zeigte die DN-Variante des Proteins eine auffällig unterschiedliche Verteilung in den Herzmuskelzellen.



**Abbildung 33: Virusvermittelte Expression einer dominant-negativen PKC $\epsilon$ -GFP-Mutante in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Frisch isolierte Myozyten wurden mit einem Adenovirus transduziert, das zur Expression einer konstitutiv-inaktiven PKC $\epsilon$ -GFP Variante (DN-PKC $\epsilon$ -GFP) führte. An Tag 3 nach Isolation wurde die Lokalisation durch Konfokalmikroskopie untersucht. Exemplarisch ist ein konfokaler Schnitt durch eine typische Zelle (**A**) sowie eine Detailvergrößerung (**B**) dargestellt. Das bekannte Verteilungsmuster der wt-PKC $\epsilon$  war im inaktiven Zustand der Kinase nicht mehr vorhanden. Das Protein war in den beiden Zellkernen, sowie an der Membran der Kardiomyozyten angereichert. Eine schwache Querstreifung war ebenfalls zu erkennen, die sich aber nicht gleichmäßig über die Zelle erstreckte. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Die Fluoreszenz war hauptsächlich in den beiden Zellkernen, sowie an der Membran der Myozyten zu finden. Die scheinbare Querstreifung war wohl nicht auf eine Lokalisation an den Z-Scheiben zurückzuführen, sondern bildete wahrscheinlich die Lokalisation an der Membran ab. Durch Lokalisation an den T-Tubuli ergibt sich durch diese Membraneinstülpungen ebenfalls eine optische Querstreifung. Zudem waren an einigen Stellen gepunktete Strukturen zu erkennen, die angeschnittene T-Tubuli darstellen könnten.

Die Lokalisation an den Z-Scheiben schien aufgehoben zu sein, was durch immunzytochemische Analyse bestätigt wurde (Abbildung 34, oben). Dass die

Aufnahme des  $\alpha$ -Aktinins in der Mitte der Zelle etwas dunkler ist, lag an einer schlechteren Permeabilisierung als in den Außenbereichen und hatte keinen Einfluss auf die Aussage. Die Überlagerung der Aufnahmen der DN-PKC $\iota$ -GFP und des  $\alpha$ -Aktinins ließ keinen Schluss auf eine Kolo-kalisation zu. Wie bereits besprochen, handelte es sich wahrscheinlich um eine Kolo-kalisation mit der Membran und den dazugehörigen T-Tubuli.

Zudem zeigte die Verteilung der dominant-negativen Mutante keine Längs-streifung in der Zelle, was darauf schließen ließ, dass auch die Kolo-kalisation mit dem Aktinzytoskelett aufgehoben war. Diese Beobachtung wurde durch Anfärben des F-Aktins mit Phalloidin und Überlagerung beider Aufnahmen bestätigt (Abbildung 34, unten).

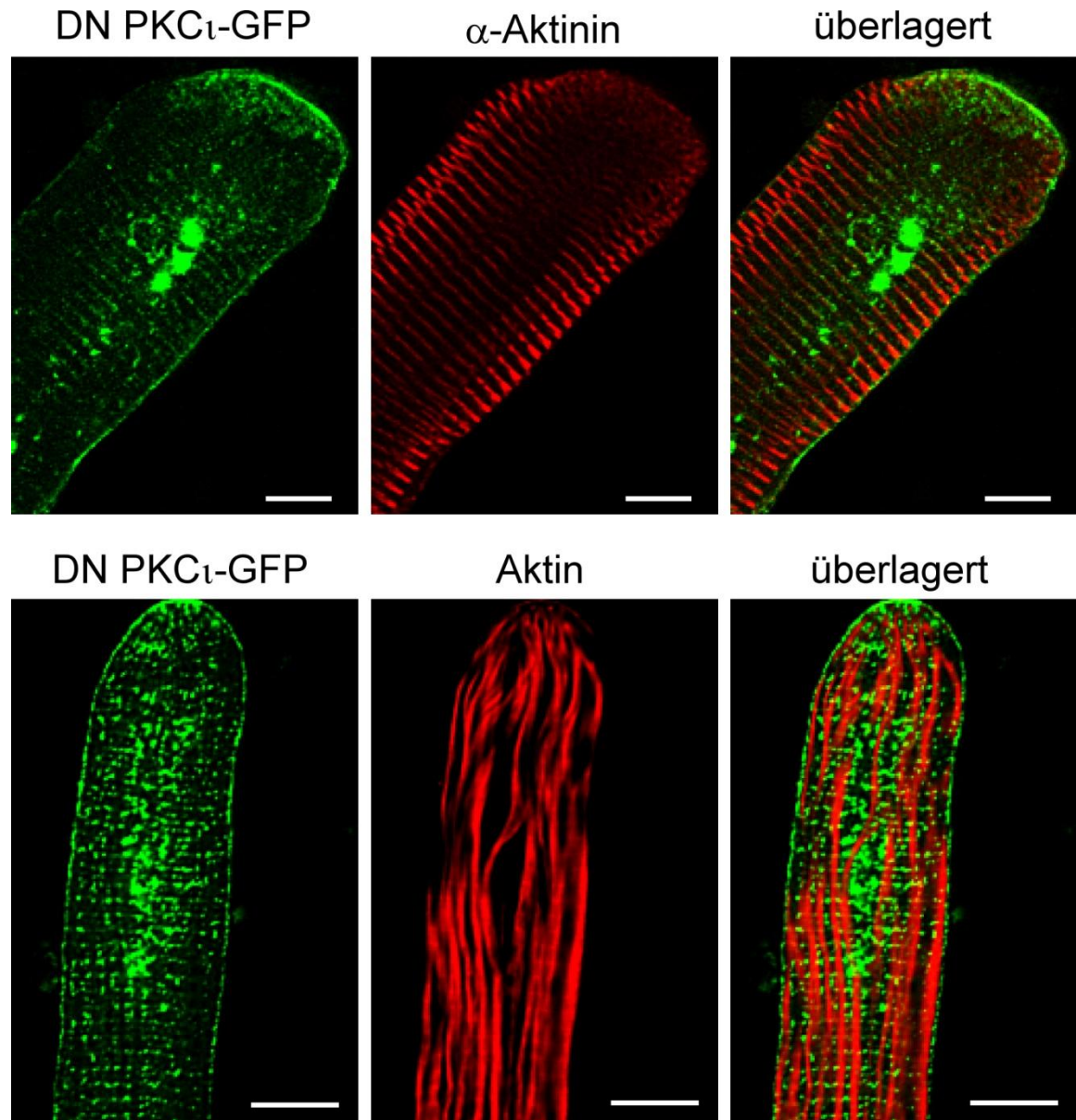
Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation der DN-PKC $\iota$  sehr deutlich von der Verteilung der wt-PKC $\iota$  und der CA-PKC $\iota$  in Kardiomyozyten unterschied. Während das wildtyp-Protein und die aktive Mutante in ihrer Lokalisation relativ ähnlich waren, unterschied sich die Verteilung der DN-Mutante stark von der der beiden anderen Proteine. Die Kolo-kalisation mit dem Aktinzytoskelett und dem Z-Scheibenprotein  $\alpha$ -Aktinin, die für die wt- und die CA-Kinase typisch war, war bei der negativen Mutante aufgehoben. Dafür schien die Membranlokalisation der DN-PKC $\iota$  wesentlich ausgeprägter zu sein, als bei den anderen Varianten.

Das Verteilungsmuster der DN-PKC $\iota$  in den Kardiomyozyten zeigte deutliche Unterschiede zu denen der wt-PKC $\iota$  und der CA-Mutante. Damit wurde gezeigt, dass die Lokalisation der PKC $\iota$  in adulten Kardiomyozyten abhängig vom Aktivitätsstatus der Kinase war.

Diese Beobachtungen, dass die CA-Mutante sowie die aktivierbare wt-PKC $\iota$  an Elementen des kontraktile Apparates lokalisiert waren, legten die Vermutung nahe, dass die PKC $\iota$  eine Funktion bei der Muskelkontraktion oder dem ihr zugrundeliegenden Prozess der Erregungs-Kontraktions-Kopplung ausübt.



Nächster Schritt war daher die Untersuchung dieser Prozesse in Kardiomyozyten, die die unterschiedlichen Varianten der PKC $\epsilon$  nach adenoviral vermitteltem Gentransfer exprimierten.



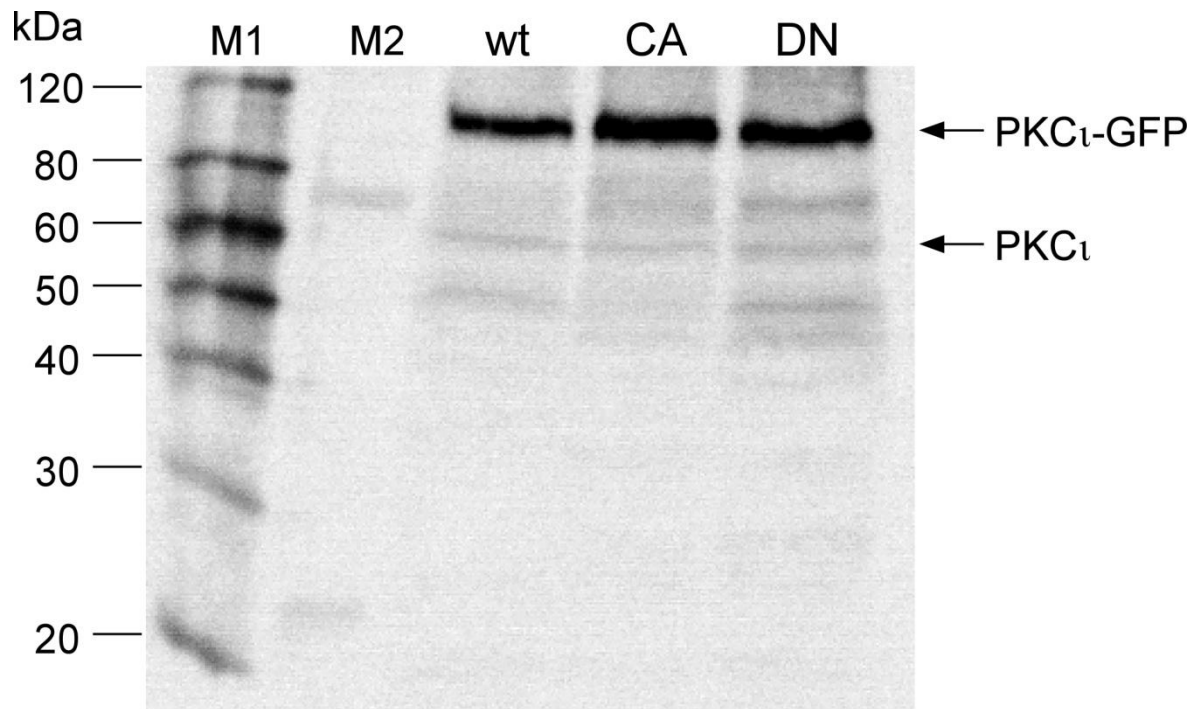
**Abbildung 34: Lokalisation der dominant-negativen PKC $\epsilon$ -GFP Mutante in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Zellen wurden an Tag 3 nach Isolation und Transduktion mit 4 % PFA fixiert und mit einem anti  $\alpha$ -Aktinin Antikörper (oben) bzw. mit Atto 647N-Phalloidin (unten) angefärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder zeigt, dass keine Kolokalisation mit den beiden Zytoskelettproteinen bestand. Der Skalenstrich entspricht 10  $\mu$ m.

### 4.2.5 Maß der Überexpression der PKC $\epsilon$ bei der Durchführung der Kalzium- und Kontraktionsmessungen

Für die folgenden Kalzium- und Kontraktionsmessungen wurde davon ausgegangen, dass ein Beitrag der endogen exprimierten PKC $\epsilon$  vernachlässigbar war und eventuelle Effekte ausschließlich auf die eingebrachten Konstrukte zurückzuführen waren. Durch eine Western Blot-Analyse mit Zelllysaten transduzierter Kardiomyozyten wurden daher zunächst die Expressionsraten der einzelnen PKC $\epsilon$ -Varianten bestimmt, um nachzuweisen, dass die Konzentration der Fusionsproteine zum Messzeitpunkt deutlich über der der endogenen PKC $\epsilon$  lag. Dadurch konnte allerdings nur die durchschnittliche und nicht die individuelle Expression gezeigt werden.

Hierzu wurden Zellen mit den gleichen Mengen Viruslösung transduziert, wie sie auch für die nachfolgenden Experimente zur Verwendung kamen. An DIV3 wurden Zelllysate hergestellt und im Western Blot auf die Expression der endogenen PKC $\epsilon$  und der PKC $\epsilon$ -Fusionsproteine untersucht (Abbildung 35).

Nach Analyse der Bandenintensität in Image J stellte sich heraus, dass die wt-PKC $\epsilon$ -GFP durchschnittlich in einer 10-fach größeren Menge in den Zellen vorlag, als die endogene. Die dominant-negative Variante war im Schnitt 17-fach höher exprimiert und die konstitutiv-aktive Variante lag sogar 29-mal häufiger in den Zellen vor, als die endogene PKC $\epsilon$ . Die zusätzlichen Banden resultierten hier aus der Situation bei starker Überexpression. Dabei kommt es häufig zu Abbauprodukten, durch die Banden entstehen, die im nativen Zustand der analysierten Zellen nicht vorhanden sind.



**Abbildung 35: Expressionsraten der PKC $\iota$ -GFP-Varianten in adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Frisch isolierte Myozyten wurden mit den gleichen Mengen Viruslösung transduziert, wie sie für die Ca<sup>2+</sup>- und die Sarkomerlängenmessungen verwendet wurden. An DIV3 wurden Zellextrakte hergestellt, die im Western Blot auf die Expression der Fusionsproteine im Vergleich zur endogenen PKC $\iota$  untersucht wurden. Zu den Messzeitpunkten war eine deutlich höhere Konzentration der Fusionsproteine in den Zellen vorhanden im Vergleich zum normalen Expressionsniveau der endogenen PKC $\iota$ . M1: Roti<sup>®</sup>-Mark WESTERN-Marker; M2: Precision Plus Protein Dual Color Standard

Da dieser Versuch nur dazu dienen sollte, eine deutlich stärkere Expression der Fusionsproteine zu zeigen, wurde nicht darauf geachtet, gleiche Mengen an Protein aufzutragen, weshalb die unterschiedlichen Bandenintensitäten der endogenen PKC $\iota$ , sowie der verschiedenen PKC $\iota$ -GFP-Varianten nicht miteinander vergleichbar waren und keine Aussage über die Transduktionseffizienz zuließen.

Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass die Expression der Fusionsproteine die der endogenen PKC $\iota$  deutlich überstieg. Bei den angegebenen Verhältnissen der PKC $\iota$ -GFP zum endogenen Protein ist zu beachten, dass es sich um einen Proteinextrakt einer unbestimmten Zellzahl handelte und somit ein Durchschnittswert aller darin enthaltenen Zellen abgebildet wurde. Für die einzelnen



Experimente wurden dagegen nur deutlich exprimierende Zellen, also Zellen, die eine deutlich höhere Fluoreszenz als untransduzierte Zellen aufwiesen, ausgewählt. Die tatsächliche Rate der Expression der PKC $\epsilon$ -GFP-Varianten im Verhältnis zur endogenen PKC $\epsilon$  in den analysierten Zellen lag daher wohl noch über den hier angegebenen Werten.

### 4.2.6 Einfluss der PKC $\epsilon$ auf den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten

Um zu untersuchen, ob die PKC $\epsilon$  einen Einfluss auf den Ca $^{2+}$ -Haushalt adulter Kardiomyozyten besitzt, wurden Kalziummessungen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2 bei elektrischer Stimulation der Zellen durchgeführt. Frisch isolierte Rattenmyozyten wurden jeweils mit einem der drei PKC $\epsilon$ -GFP-Viren oder einem YFP-Virus zur Kontrolle transduziert.

Eine virale Infektion der Zellen und die daraus resultierende Übernahme der zelleigenen Proteinexpressionsmaschinerie zur Expression des gewünschten Proteins bedeuteten einen deutlichen Eingriff in die Zelle. Daher wurden Zellen als Kontrolle mit einem Virus transduziert, das für das Fluoreszenzprotein YFP kodierte. Damit war es möglich zu testen, ob die Viruszugabe und die Expression eines Fluoreszenzproteins an sich schon einen Effekt auf die zu untersuchenden Parameter ausübten. Anstatt eines leeren Virus wurde ein YFP-Virus gewählt, um spezifisch die transduzierten Zellen auswählen zu können, wie es auch bei den PKC $\epsilon$ -GFP Konstrukten erfolgte. Zum Vergleich wurden die Messungen auch mit völlig unbehandelten Myozyten als weitere Kontrolle durchgeführt.

Alle Messungen erfolgten an Tag 3 nach Isolation bei 37 °C und einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz nach dem in Abbildung 15 angegebenen Protokoll.

In den Gesichtsfeldern wurden nur diejenigen Zellen analysiert, die mindestens eine doppelt so hohe Fluoreszenz aufwiesen wie untransduzierte Zellen. Es wurden also nur transduzierte Zellen ausgewertet, die das jeweilige Fusionsprotein anhand ihrer Fluoreszenz sichtlich exprimierten.

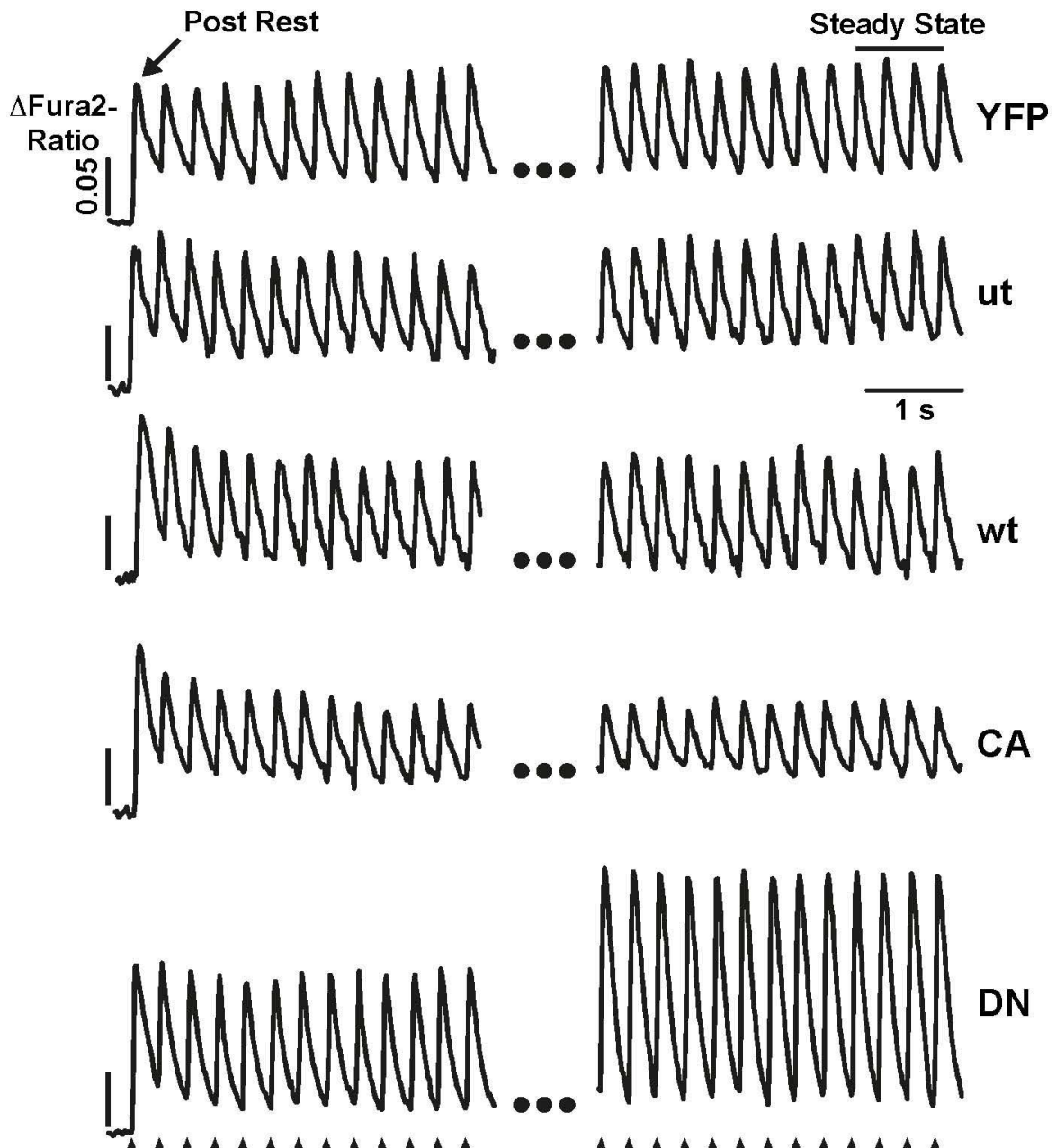
Unter den beschriebenen Messbedingungen konnten von Zellen aller 5 Behandlungen Kalziumsignale gemessen werden. Typische Kalziumtransienten der unterschiedlich behandelten Zellen sind in Abbildung 36 dargestellt.

Die Transienten der beiden Kontrollbedingungen unterschieden sich auf den ersten Blick nicht, was vermuten ließ, dass die Zugabe von Viruspartikeln zu den Kardiomyozyten und die daraus resultierende Infektion der Zellen, sowie die Expression eines Fluoreszenzproteins an sich keine Veränderungen in der Kalziumregulation der Kardiomyozyten zur Folge hatte. Diese These wurde in der späteren statistischen Auswertung bestätigt (Abbildung 37).

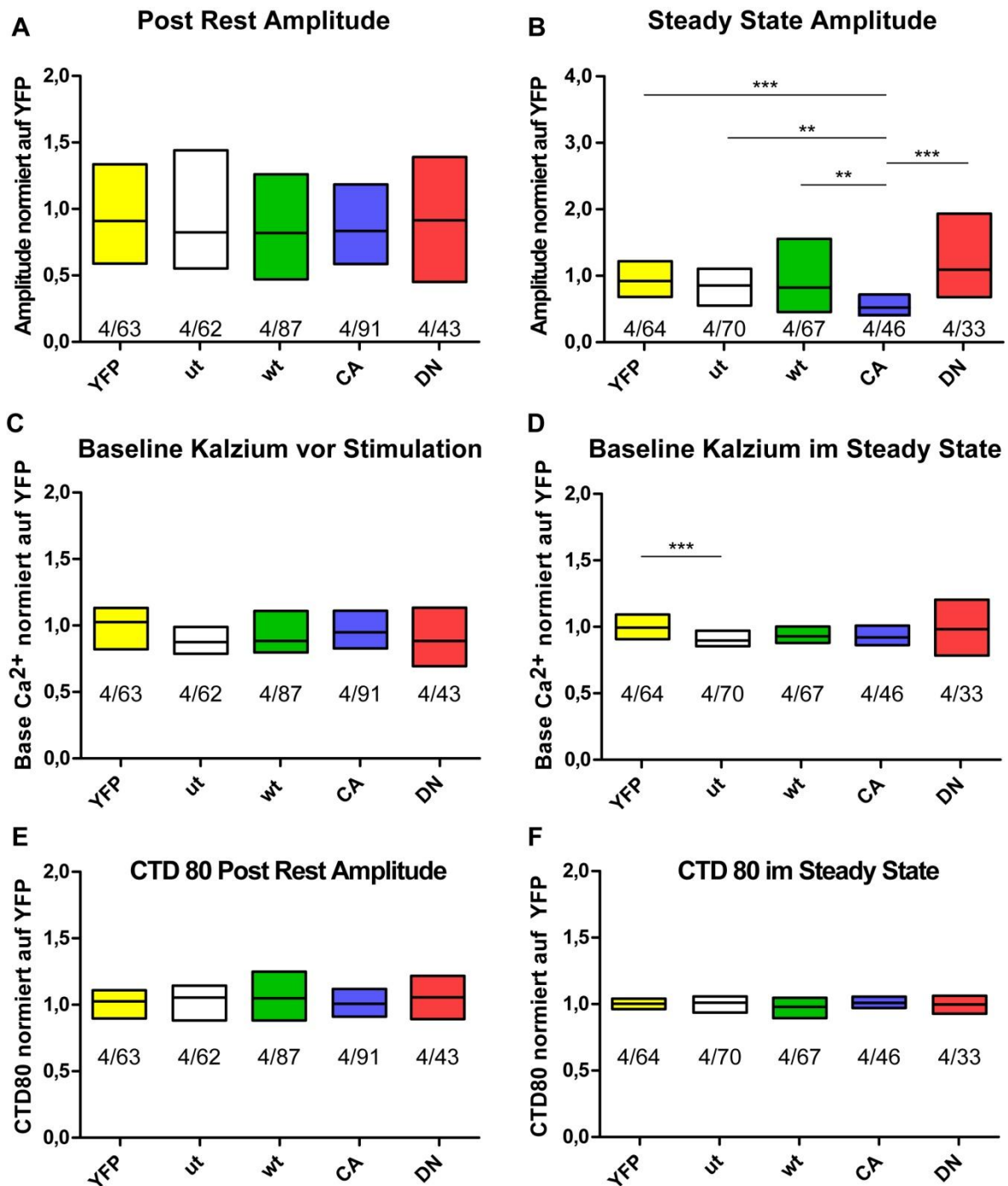
Von den einzelnen Zellen wurde das „Post Rest“-Verhalten, sowie das Verhalten im „Steady State“ hinsichtlich Amplitude, Kalziumbasislinie und Kalziumtransientendauer bis 80 % Abnahme (CTD80) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Igor Pro und MS Excel. Eine genaue Analyse der einzelnen Parameter ist in Abbildung 37 dargestellt, wobei alle Werte jeweils auf die mit dem YFP Virus infizierten Zellen normiert sind.

Es ist festzuhalten, dass die einzigen Unterschiede im Kalziumverhalten der Zellen im „Steady State“ zu beobachten waren. Deutliche Unterschiede wurden in den Kalziumtransientenamplituden detektiert. Auffällig war die Höhe der „Steady State“ Amplitude der CA- und der DN-PKC $\iota$  exprimierenden Myozyten. Während Zellen mit wt-PKC $\iota$  keine signifikanten Unterschiede zu den beiden Kontrollbedingungen zeigten, wiesen Zellen, die CA-PKC $\iota$  exprimierten, eine deutlich niedrigere Amplitude der Kalziumtransienten auf verglichen sowohl mit den Zellen beider Kontrollbedingungen, als auch mit den Zellen, die wt-PKC $\iota$  exprimierten. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die die DN-Mutante der PKC $\iota$  exprimierten eine höhere Kalziumtransientenamplitude. Während diese Erhöhung nur eine Tendenz zu den Kontrollen darstellte, gab es einen signifikanten Unterschied zu den Zellen mit der CA-Mutante. Zellen, die die wt-Form der PKC $\iota$  exprimierten, zeigten eine Amplitude im „Steady State“, die zwischen denen der konstitutiv-aktiven und der dominant-negativen Form lag. Es bestand hier also eine Konsistenz innerhalb der Ergebnisse der Aktivitätstests und den Amplituden der Kalziumtransienten. Mit

einer Zunahme der Aktivität der PKC $\epsilon$  in Kardiomyozyten kam es zu einer Abnahme in der Höhe dieser Amplituden.



**Abbildung 36: Typische Kalziumtransienten der virustransduzierten und untransduzierten Kardiomyozyten.** Kalziummessungen wurden an Tag 3 nach Isolation bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden elektrisch mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert. YFP, Zellen mit YFP-Virus transduziert; ut, untransduzierte Zellen; wt, Zellen mit wt-PKC $\epsilon$ -GFP-Virus transduziert; CA, Zellen mit CA-PKC $\epsilon$ -GFP-Virus transduziert; DN, Zellen mit DN-PKC $\epsilon$ -GFP-Virus transduziert.



**Abbildung 37: Analytierte Parameter aus den Kalzium-Messungen an virustransduzierten und untransduzierten adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Kalziummessungen wurden an Tag 3 nach Isolation bei 37 °C und einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz durchgeführt. Die Transienten wurden aufgezeichnet und auf ihre Amplitude, Kalziumbasislinie und CTD80 hin analysiert. Die N-Zahlen beziehen sich auf Versuchstiere/Zellzahlen. **A** „Post Rest“ Amplitude, **B** „Steady State“ Amplitude, **C** Kalziumbasislinie vor der Stimulation, **D** Kalziumbasislinie im „Steady State“, **E** CTD80 der „Post Rest“ Amplitude, **F** CTD80 der Amplituden im „Steady State“

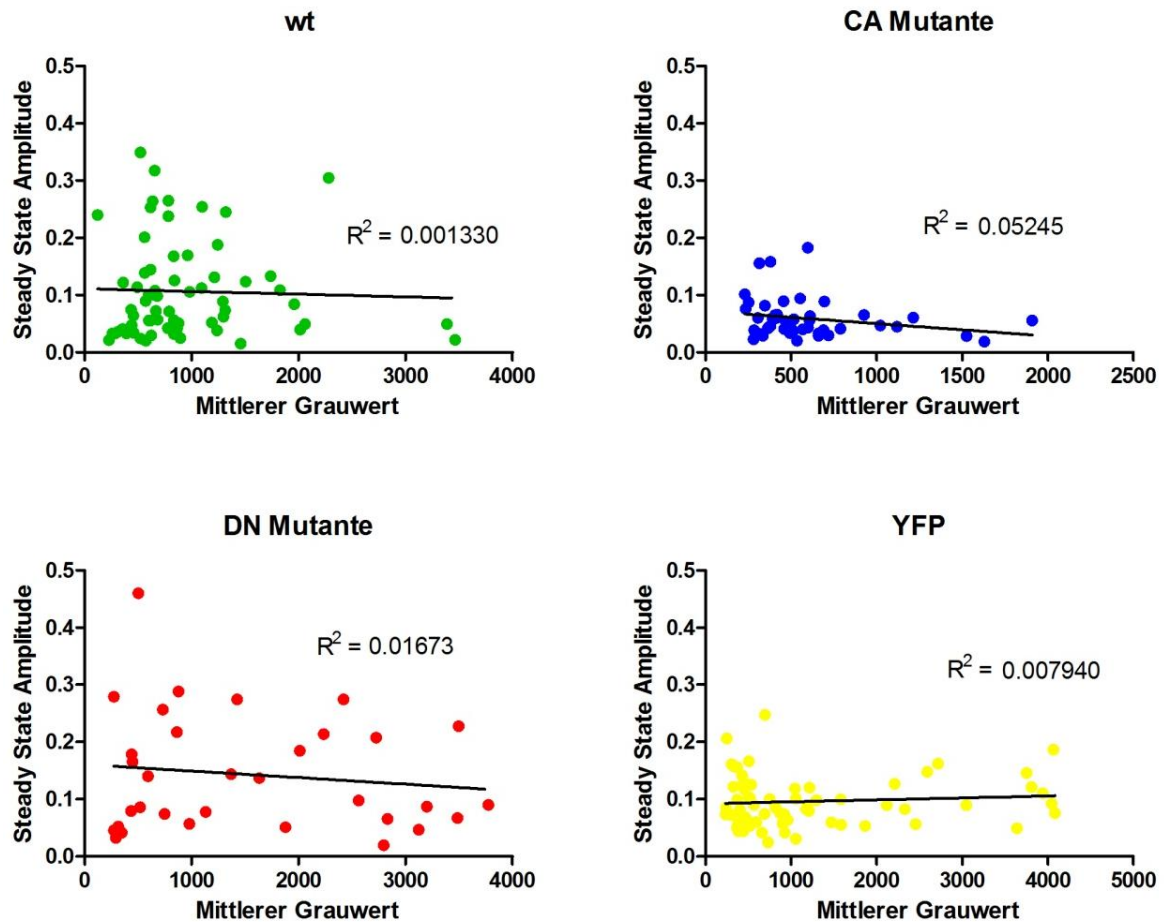
In Bezug auf die Kalziumbasislinie der Kardiomyozyten hatte die PKC<sub>1</sub> keinen Einfluss. Auffallend bei diesem Parameter war der signifikante Unterschied zwischen untransduzierten Zellen und Zellen nach adenoviralem Gentransfer von YFP. Dies kann eventuell durch die Überlappung der Anregungs- und Emissionsspektren von Fura-2 und YFP erklärt werden. Allerdings gibt es zwischen Fura-2 und GFP auch eine solche sogar noch größere Überlappung, die sich aber hier nicht auswirken schien. Die Sequenz beider Fluoreszenzproteine unterscheidet sich in nur wenigen Aminosäuren, was die Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge zur Folge hat. Inwiefern sich die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften von GFP und YFP auf die Fura-2 Signale auswirken, wurde aber nicht näher untersucht. Trotz der Unterschiedlichkeit der beiden Fluoreszenzproteine erfolgte die Normierung der einzelnen Messwerte auf die Zellen, die mit dem YFP-Virus transduziert wurden.

In der Dauer der Transienten wurden keinerlei Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen detektiert. Die Erhöhung oder Verringerung der Kalziumamplitude führte also nicht gleichzeitig dazu, dass die Dauer der Kalziumsignale verändert war. Die „Ca<sup>2+</sup>-Removal“-Prozesse schienen daher nicht von der Aktivität der PKC<sub>1</sub> beeinflusst zu werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die wichtigsten Unterschiede im Kalzium-Verhalten der Herzmuskelzellen, die die unterschiedlichen PKC<sub>1</sub>-Varianten exprimierten, die Amplitude der Kalziumtransienten betrafen. Dabei war eine signifikante Verringerung der Amplitude im Fall der CA-Mutante zu verzeichnen, während die DN-Mutante eine Erhöhung der Amplitude zur Folge hatte.

Es sollte nun geklärt werden, ob die Höhe der Amplitude im „Steady State“ vom Expressionsniveau der einzelnen PKC<sub>1</sub>-Varianten abhing. Ob also die Amplitude bei den Zellen, die die CA-Mutante exprimierten mit höherem Expressionsniveau geringer war und im Gegenzug, ob Zellen mit höherem Expressionsniveau der DN-Mutante noch höhere Werte für die Kalziumamplitude aufwiesen. Es wurde daher von allen Zellen, die in die Statistik eingingen die Fluoreszenzintensität (Durchschnitt über die Zellfläche) als Maß für die Proteinmenge bestimmt und die jeweilige Amplitude in Abhängigkeit zum mittleren Grauwert der einzelnen Zellen

aufgetragen (Abbildung 38). Dabei zeigte sich, dass die Kalziumamplituden keine lineare Abhängigkeit zu den Expressionsniveaus der verschiedenen PKC $\epsilon$ -Varianten aufwiesen. Die Vermutung, dass die Amplituden in einem linearen Zusammenhang mit der Proteinmenge stehen könnten, wurde nicht bestätigt.



**Abbildung 38: „Steady State“ Amplituden in Relation zum Expressionsniveau.** Von allen Zellen, die in die Ergebnisse aufgenommen wurden, wurde der mittlere Grauwert als Maß für das Expressionsniveau der verschiedenen Proteine bestimmt und in Relation zur Kalziumamplitude im „Steady State“ gesetzt. Für keine der Bedingungen war ein linearer Zusammenhang von Amplitude und Proteinmenge gegeben, was an den sehr niedrigen R<sup>2</sup> Werten deutlich wird.

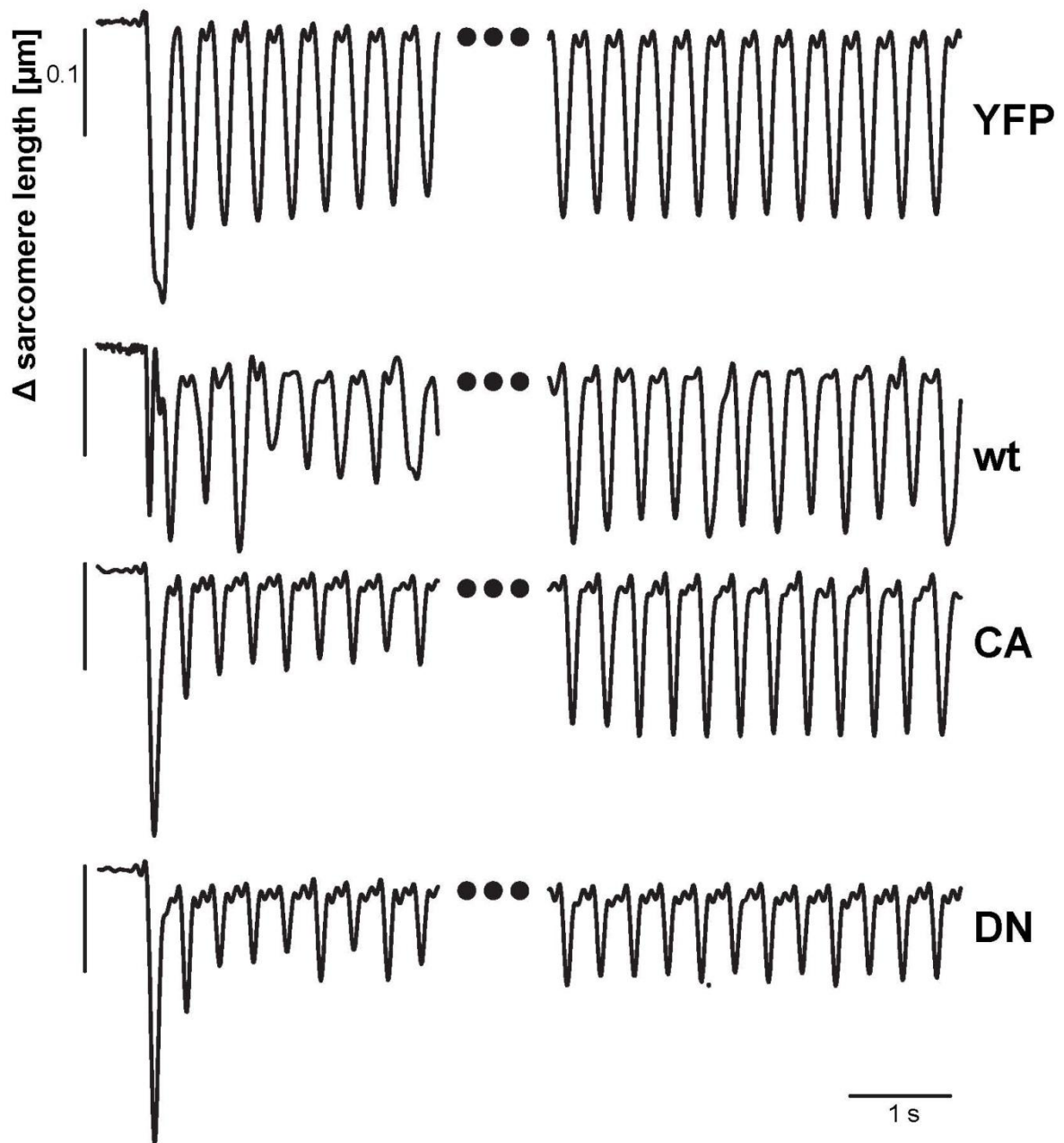
Trotzdem ist festzuhalten, dass die Streuung in der Amplitudenhöhe bei der konstitutiv-aktiven PKC $\epsilon$ -Variante sehr viel geringer ausfiel, als bei der wildtyp und

der dominant-negativen Kinase. Der Effekt, der durch die CA-PKC<sub>1</sub> in den Zellen ausgelöst wurde, war sehr homogen im Gegensatz zu dem, den die DN-Mutante verursachte, bei der die Streuung sowohl bezogen auf das Expressionsniveau, als auch auf die Amplitudenhöhe, am größten ausfiel. Es war bei dieser Bedingung am ehesten ein linearer Trend zu erkennen, der wie erwartet darauf hindeutete, dass mit höherer Kopienzahl der CA-PKC<sub>1</sub> die Kalziumamplitude tatsächlich abnahm.

### **4.2.7 Einfluss der PKC<sub>1</sub> auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten**

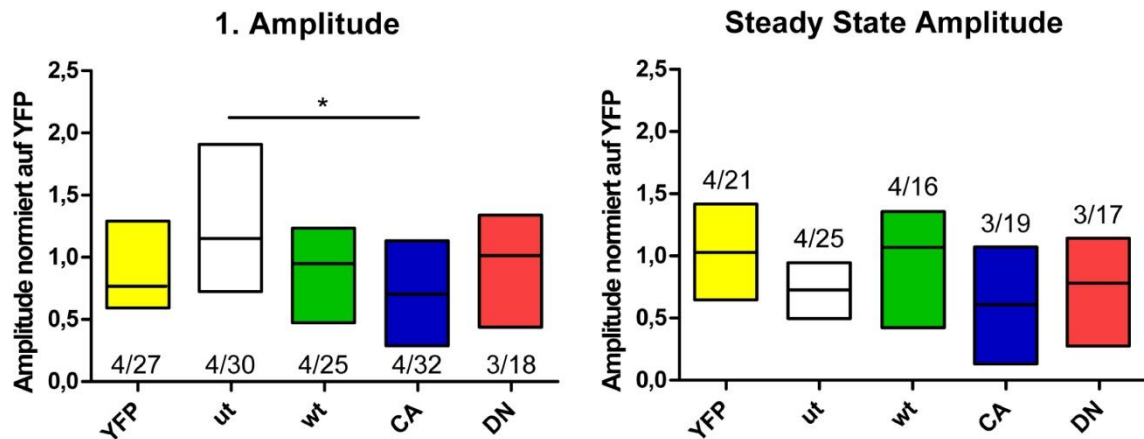
Nachdem eine mögliche Funktion der PKC<sub>1</sub> bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung der Kardiomyozyten aufgezeigt werden konnte, wurde in einem anschließenden Experiment analysiert, ob die virusvermittelte Expression der einzelnen PKC<sub>1</sub>-Varianten auch einen Effekt auf die Kontraktion der Muskelzellen hatte.

Zellen derselben Bedingungen wurden für Sarkomerlängenmessungen verwendet und auf ihr Kontraktionsverhalten hin analysiert. Genau wie bei den Kalziummessungen wurden als Versuchsbedingungen 37 °C und eine Stimulationsfrequenz von 3 Hz gewählt, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse ermöglichte. Die Datenanalyse erfolgte mit den Programmen Igor Pro und MS Excel. Die Zellen wurden auf ihre Sarkomerlängen während der 1. Kontraktion und im „Steady State“ untersucht. Abbildung 39 zeigt die Originalkontraktionsdaten typischer Zellen aller Bedingungen. Die ausgewerteten Ergebnisse sind in Abbildung 40 zusammengefasst.



**Abbildung 39: Typische Sarkomerlängenänderungen der virustransduzierten und untransduzierten Kardiomyozyten.** Sarkomerlängenmessungen wurden an Tag 3 nach Isolation bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden elektrisch mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert. YFP, Zellen mit YFP-Virus transduziert; wt, untransduzierte Zellen; wt, Zellen mit wt-PKC $\epsilon$ -GFP-Virus transduziert; CA, Zellen mit CA-PKC $\epsilon$ -GFP-Virus transduziert; DN, Zellen mit DN-PKC $\epsilon$ -GFP-Virus transduziert.





**Abbildung 40: Sarkomerlängen der virustransduzierten und untransduzierten adulten Kardiomyozyten der Ratte.** Sarkomerlängenmessungen wurden an Tag 3 nach Isolation bei 37 °C mit einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz durchgeführt. Die Änderungen der Sarkomerlängen der einzelnen Zellen wurden für die 1. Kontraktion und im „Steady State“ bestimmt und auf die Werte der mit YFP transduzierten Zellen normiert. Die N-Zahlen beziehen sich auf Versuchstiere/Zellzahl.

Die PKC $\iota$  hatte offenbar keinen Einfluss auf die Sarkomerlänge der Herzmuskelzellen während der Kontraktion. Der einzige signifikante Unterschied, der festgestellt wurde, bestand zwischen untransduzierten Zellen und Zellen mit der konstitutiv-aktiven Variante bei der ersten Kontraktion.

### 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet. Zum einen wurden Veränderungen in der Transkription von PKC-, PKD- und PLC-Isozymen nach chronischer hormoneller Stimulation mit ET-1 und PE untersucht. Die Stimulation führte zu Veränderungen in der Transkription verschiedener Isozyme der untersuchten Proteinfamilien.

In einem zweiten Projekt wurde die Lokalisation der PKC $\epsilon$  in Abhängigkeit ihrer Aktivität in Kardiomyozyten nach viralem Gentransfer analysiert, wobei sich deutliche Unterschiede je nach Aktivitätsstatus ergaben. Zusätzlich wurde ihr Einfluss auf den Kalziumhaushalt und die Sarkomerlängen bei der Kontraktion untersucht, wobei ein Effekt der PKC $\epsilon$  auf die Kalziumtransienten der Kardiomyozyten festgestellt wurde.

#### 5.1 Genexpressionsanalyse von Kardiomyozyten nach chronischer hormoneller Stimulation mit Endothelin-1 und Phenylephrin

Die Hormone Endothelin-1 und Phenylephrin stehen unter anderem mit der Entwicklung von Pathologien im Herzen in Zusammenhang. Die daran beteiligten Signalkaskaden sind wie bereits beschrieben relativ gut charakterisiert (siehe 2.5). Die Rezeptoren für diese Hormone gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Aktivierung der G $_q$ /PLC $\beta$ -Signalkaskade spielt vor allem eine Rolle bei der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie, an deren Entstehung auch einige Isozyme der PKC Familie maßgeblich beteiligt sind (Rohini *et al.*, 2010). G $_{\alpha q}$  führt zur Aktivierung der PLC $\beta$ , welche die Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol 4, 5-bisphosphat zu IP $_3$  und DAG katalysiert. IP $_3$  fördert die Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern durch IP $_3$ -Rezeptoren, während DAG in der Membran verbleibt und dort zur direkten Aktivierung einiger PKC Isozyme führt. Es kommt aber durch die chronische Stimulation mit diesen Hormonen auch zu Veränderungen im Genexpressionsmuster, was als Erregungs-Transkriptions-

Kopplung bezeichnet wird. Es wurde daher in dieser Studie untersucht, inwiefern auch die mRNA Transkription beteiligter Proteine beeinflusst wird.

Das Profiling von mRNA Transkription hat sich in den vergangenen Jahren zu einer Standardmethode entwickelt. Es handelt sich dabei um die Quantifizierung der mRNA, die als Verbindungsglied zwischen DNA und Proteinen Aufschluss über die Genexpression geben kann. Durch die Detektion von Veränderungen der Transkriptionsrate können so wichtige Aussagen getroffen werden. Die quantitative Echtzeit-PCR hat sich dabei zu einer beliebten Methode zur Quantifizierung von mRNA Transkriptionsraten entwickelt. Die Methode ist schnell, extrem sensitiv und kommt mit minimalen Mengen RNA als Ausgangsmaterial aus (Radonic *et al.*, 2004; Hugget *et al.*, 2005).

### 5.1.1 Auswahl der zur Normierung verwendeten Housekeeping-Gene

Von zentraler Wichtigkeit bei der Auswertung solcher Transkriptionsanalysen ist die Normierungsstrategie. Hierfür werden in der Regel interne Kontrollgene verwendet, deren Expression unter den Versuchsbedingungen stabil sein muss. Das heißt, die Transkriptionsrate der Housekeeping Gene darf nicht durch die Versuchsbedingungen reguliert oder beeinflusst werden. Durch die Normierung können diverse Fehler (wie unterschiedliche Mengen an Ausgangsmaterial, Unterschiede in der Qualität des Ausgangsmaterials oder Schwankungen bei der RNA-Präparation und cDNA-Synthese) ausgeglichen werden, da die mRNA der Referenzgene denselben Präparationsschritten unterliegt, wie die der Zielgene (Radonic *et al.*, 2004; Hugget *et al.*, 2005).

Bei der Auswahl der HK-Gene wurde zum einen auf die bestehende Expertise in der Arbeitsgruppe zurückgegriffen und zum anderen eine zusätzliche Literaturrecherche durchgeführt. Arbp (manchmal auch als Rplp0 bezeichnet) wurde zum Beispiel schon bei einer früheren Genexpressionsanalyse humaner Proben in der Arbeitsgruppe als Referenzgen verwendet, wobei das humane Homolog als Hup0 bezeichnet wird. Zusätzlich wurde es in einer Publikation von Dheda *et al.* (2004) als Referenzgen getestet und als sehr stabil bezeichnet und in Kosloski *et al.*

(2009) ebenfalls als HK-Gen verwendet. Es handelt sich bei Arbp um ein 317 Aminosäuren großes ribosomales Protein der 60 S Untereinheit. Das Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und besteht aus 6 Exons.

Prdx-2 wurde in die Tests mit aufgenommen, da es von einer anderen Arbeitsgruppe getestet und empfohlen wurde (persönliche Mitteilung von Dr. Cedric Viero, Wales Heart Research Institute, Cardiff). Das 198 Aminosäuren große Protein gehört der Peroxiredoxin-Familie an und reduziert Wasserstoffperoxid sowie Alkyl-Hyperoxide und besitzt damit eine antioxidative Schutzfunktion. Eine generelle Tauglichkeit als HK-Gen scheint daher fraglich, da der oxidative Stress unter vielen Bedingungen verändert sein kann und es damit sicher auch zu einer Regulation antioxidativer Enzyme kommt. Dennoch war Prdx-2 unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen stabil und daher als Referenzgen sehr gut geeignet. Das entsprechende Gen befindet sich auf Chromosom 19 und besteht aus 6 Exons.

Hprt1 wurde in Vandesompele *et al.* (2002) ausführlich als Referenzgen getestet und in den meisten Geweben als sehr gut befunden. Es handelt sich um ein Enzym, das am Purinstoffwechsel beteiligt ist. Das Gen für das 218 AS Protein befindet sich auf dem X-Chromosom und besteht aus 9 Exons.

Die 3 ausgewählten Housekeeping-Gene gehören also ganz unterschiedlichen funktionellen Gruppen an, was die Möglichkeit einer Ko-Regulation minimiert. Dies war außerordentlich wichtig, denn gemeinsam regulierte Referenzgene könnten eventuelle Schwankungen nicht gegenseitig ausgleichen, was die Ergebnisse verfälscht hätte.

Die Entscheidung 3 Housekeeping-Gene für die Normierung zu nutzen, resultierte aus der Tatsache, dass bei der Messung immer wieder Fehlerquellen auftreten können und mehrere Referenzmessungen daher eine validere Grundlage für die Normierung bilden. Da hier mit sehr geringen Mengen RNS gearbeitet wurde und auch geringe Schwankungen wichtige Hinweise liefern können, sollte die Normierung so genau wie möglich sein. Zudem wird in einschlägiger Literatur die Verwendung mehrerer Referenzgene zur Normierung empfohlen (Vandesompele *et al.*, 2002).

### 5.1.2 Test auf Poolen

In einem weiteren Vorversuch wurde getestet, ob ein Poolen von Proben unterschiedlicher Ratten generell möglich war. Da nur Ratten mit gleichem genetischem Hintergrund ähnlichen Alters und Gewichts verwendet wurden, war davon auszugehen, dass die Transkription der zu untersuchenden Gene auf gleichem Niveau lag. Dies wurde exemplarisch an 5 Ratten getestet, indem die Transkription von ausgesuchten Genen gemessen und statistisch analysiert wurde. Die statistische Analyse ergab, dass ein Poolen der Proben in Bezug auf die 3 getesteten Gene *Rpl10a*, *Actc1* und *Hprt1* möglich war. Daraus wurde auch auf gleiche Expressionsniveaus für andere Gene geschlossen. Ein Testen der Expression aller Gene und aller Tiere war aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und vor allem der RNS-Ausbeute aus den Zellen einzelner Tiere nicht möglich. Da sich die Ratten aber in der Expression der exemplarisch ausgewählten Gene so stark ähnelten, war davon auszugehen, dass es auch bei anderen Genen keine signifikanten Unterschiede gab. Daher wurden die Proben gleicher Bedingungen von unterschiedlichen Tieren zusammengefasst. Nur dadurch war es möglich so viele Gene in die Analyse mit aufzunehmen. Mit einzelnen Proben wäre dieser Durchsatz nicht möglich gewesen, da die Ausbeute an RNS aus den Kardiomyozyten zum Teil sehr gering war. Gerade für Zellen nach 6 Tagen in Kultur war es schwierig eine genügend große Menge RNS zu gewinnen, da viele der Zellen bis dahin nicht überlebten und beim Mediumwechsel abgspült wurden. Die Konzentration der RNS-Lösungen lag zwischen 24 und 400 ng/µl. Diese Unterschiede kamen durch die Qualität der Isolation und damit die Anzahl lebender Zellen, sowie die Dauer der Kultivierung zustande. Während an DIV0 und DIV1 in der Regel 100 % der ausplattierten Zellen geerntet werden konnten, waren an DIV6 wie bereits beschrieben deutlich weniger Zellen vorhanden.

Obwohl die Tiere untereinander so ähnlich waren, dass ein Poolen der Proben keinen Informationsverlust zur Folge hatte, wurden die jeweiligen Kontrollen für die beiden Hormonbehandlungen nicht gepoolt. Auf ein Zusammenfassen der Kontrollproben wurde verzichtet, da anfangs strikt darauf geachtet wurde, Proben und Kontrollen exakt gleich zu behandeln. Das heißt also die Zellen wurden exakt gleich prozessiert und waren gleich lange eingefroren bis zur RNS-Isolation. Die

Isolation und Konzentrationsbestimmung der RNS erfolgte ebenfalls gemeinsam. All diese Prozesse beinhalten mögliche Fehlerquellen. Daher schien es sinnvoll, die Kontrollen weiterhin getrennt zu behandeln und für jede der Hormonbehandlungen eine eigene Kontrolle zu beizubehalten.

### 5.1.3 Genexpressionsanalyse

Durch das Poolen der Proben unterschiedlicher Tiere entstand die Möglichkeit eine höhere Anzahl an Genen zu testen. Dadurch konnten alle Isoformen der PKC und der PLC Familie untersucht werden unabhängig davon, ob deren Expression im Herzen in anderen Publikationen beschrieben oder ausgeschlossen wurde. Zusätzlich wurden die PKD1 und PKD3 (früher auch als PKC $\mu$  und PKC $\nu$  bezeichnet) in die Analyse mit einbezogen, sowie die SERCA-Pumpe und das Kardiomyozyten-spezifische Protein Nebulette. Für den Ryanodin-Rezeptor sowie die IP3-Rezeptoren konnten trotz mehrerer getesteter Primer-Paare keine konsistenten Signale mit zufriedenstellenden Schmelzkurven detektiert werden, weshalb diese nicht mit analysiert wurden.

Es wurde gezeigt, dass die PKCs  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\gamma$ , die PKD3, die PLCs  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\delta 3$ ,  $\varepsilon$  und  $\gamma 2$  in den adulten Ratten-Kardiomyozyten exprimiert wurden.

Diese Ergebnisse unterschieden sich zum Teil von früheren Publikationen. Zum Beispiel konnte in adulten ventrikulären Myozyten der Ratte die Expression der PKC Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\iota$  und  $\zeta$  gezeigt werden (Hudman und Standen, 2004). Dass die PKC $\beta$  und die beiden atypischen Isoformen hier nicht detektiert werden konnten, liegt wahrscheinlich an der relativ geringen Menge an RNS, die in die Reaktionen eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurden einige Reaktionen auf ein Agarosegel aufgetragen, auf dem bei starker Belichtung sehr schwache Banden detektierbar waren. Dennoch wäre eine Positivkontrolle für die qPCR mit RNS aus anderen Gewebeproben hier sinnvoll gewesen. Wenn die Anzahl der Transkripte sehr gering war, weil die Expression zum Beispiel streng reguliert ist und die Proteine eine lange Lebensdauer haben, ist es möglich, dass sie mit dieser Methode nicht detektierbar waren, obwohl sie etwa auf Proteinebene nachweisbar

sind. Da die PKC $\iota$  in dieser Arbeit durch Western Blot- und immunzytochemische Analyse in Kardiomyozyten nachgewiesen wurde, ist diese Erklärung sehr wahrscheinlich, zumal auch dort die Detektion nur schwach erfolgte. Innerhalb der Arbeitsgruppe gibt es auch Untersuchungen, die die Expression der PKC $\zeta$  in Kardiomyozyten belegen.

Von allen analysierten PLCs lieferten die PLC $\beta$ 1,3 und 4, PLC $\delta$ 3, PLC $\varepsilon$ 1 und PLC $\gamma$ 2 auswertbare Signale, was deren Expression in adulten Ratten-Kardiomyozyten belegte. Die Expression der Isoformen  $\delta$ 3 und  $\varepsilon$  im Herzen wurde bereits publiziert, während für die anderen Isoformen keine Daten über die Verteilung im Herzen vorliegen (Fukami, 2002).

Aktuell sind in Säugern 6 Unterfamilien der PLCs bekannt: PLC $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\zeta$ . Insgesamt umfassen alle Unterfamilien zusammen zur Zeit 13 Isoformen: PLC $\beta$ 1-4, PLC $\delta$ 1,3,4, PLC $\gamma$ 1,2, PLC $\varepsilon$ 1, PLC $\zeta$ 1 und PLC $\eta$ 1,2, von denen alle bis auf die PLC $\eta$ 1 und 2 in dieser Studie untersucht wurden. Die humane PLC $\eta$  wurde 2005 identifiziert und charakterisiert. Zum Zeitpunkt meiner Analyse war diese Isoform allerdings in Ratten noch nicht identifiziert beziehungsweise keine Sequenz verfügbar. Es ist aber festzuhalten, dass die humane Isoform nicht im Herzen detektiert werden konnte und hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert ist, was auf eine spezifische Funktion an neuronalen Vorgängen hindeutet (Hwang *et al.*, 2005).

In der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse wurden daher nur die PLCs  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  berücksichtigt, wobei die PLC $\zeta$  keine Signale lieferte und somit ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen wurde. Während die anderen PLCs in unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert und an diversen zellulären Reaktionen beteiligt sind, ist die PLC $\zeta$  in Säugern spezifisch in Spermien exprimiert und scheint an Vorgängen während der Befruchtung der Eizelle beteiligt zu sein (Saunders *et al.*, 2002). Es war daher nicht verwunderlich, dass die PLC $\zeta$  in den Herzmuskelzellen nicht detektiert werden konnte.

Die Signale für die PLC $\beta$ 2 wurden erst zwischen den Zyklen 31 und 39 detektiert und waren sehr ungleichmäßig. Die Expression schien daher zu schwach, um

konsistente Ergebnisse zu erzielen. Laut Fukami (2002) ist die Expression der PLC $\beta$ 2 auf hematopoetische Zellen beschränkt. Die PLC $\gamma$ 1 lieferte gute Amplifikationskurven, wobei die Schmelzkurven nicht nur einen einzelnen scharfen Peak zeigten, sondern auch auf unspezifische Signale hindeuteten. Ebenso lieferten die PLC $\delta$ 1 und 4 keine scharfen Peaks in der Dissoziationskurvenanalyse, was eventuell auf alternative Spleißvarianten zurückzuführen sein könnte. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass beide Isoformen in Kardiomyozyten exprimiert werden. Aufgrund der inkonsistenten Dissoziationskurven wurden diese Isoformen aber nicht in die Auswertung aufgenommen.

Interessant war, dass für das Herzmuskelzellprotein Nebulette keinerlei Änderungen detektiert wurden. Eine Änderung aufgrund der Hormonbehandlungen war nicht zu erwarten, jedoch zeigte die Stabilität über die Kultivierungsdauer die Qualität der Isolationsmethode sowie der Kultivierungsbedingungen. Es handelte sich von Beginn an um eine sehr reine Muskelzellkultur, bei der auch über die Kultivierungsdauer eine Proliferation von Fibroblasten verhindert wurde. Es war daher sichergestellt, dass die Zelltypzusammensetzung über die komplette Dauer der Experimente stabil war, beziehungsweise, dass ausschließlich die Genexpression in Kardiomyozyten untersucht wurde und keine Verunreinigung durch andere Zelltypen in die Ergebnisse mit eingeflossen sind.

Die relative Transkriptionsaktivität der analysierten Gene wurde jeweils in unbehandelten Zellen als Kontrolle und in chronisch hormonell stimulierten Zellen mit Endothelin-1 bzw. Phenylephrin untersucht. Es wurde analysiert, ob die Anzahl der Transkripte zwischen den Kontrollzellen und den hormonbehandelten Zellen signifikant unterschiedlich war. Für die PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PLC $\beta$ 4 und für Nebulette wurden keinerlei Unterschiede detektiert. Das bedeutet, dass die hormonelle Stimulation mit keinem der Hormone einen Einfluss auf die Expression dieser Proteine hatte und auch über die Kultivierungsdauer änderte sich die relative Anzahl der Transkripte nicht. Die Expression dieser Proteine war also unter den gegebenen Versuchsbedingungen sehr stabil. Eine Beteiligung der PKCs  $\alpha$  und  $\delta$  sowie die PLC $\beta$ 4 an der zellulären Antwort auf eine Stimulation mit beiden Hormonen ist damit aber nicht grundsätzlich auszuschließen, da dies auch über die Aktivität der vorhandenen Proteine möglich wäre. Es müssen daher neben den



genomischen auch nicht-genomische Effekte in Betracht gezogen werden. Lediglich eine Regulation auf Transkriptionsebene wurde so ausgeschlossen.

Eine Regulation ist generell auf verschiedenen Ebenen möglich. Durch die qPCR-Analyse lässt sich herausfinden, ob eine Regulation auf Transkriptionsebene stattfindet, wie es etwa bei der Erregungs-Transkriptions-Kopplung beschrieben ist. Grundsätzlich sind aber verschiedene Szenarien möglich, wenn ein bestimmtes Protein vermehrt benötigt wird. Zum Beispiel kann auch die Stabilität der mRNA verändert sein und damit die Anzahl der an ihr translatierten Proteine. Ein sehr wichtiger Aspekt ist auch die Aktivität der Proteine. Zellen sind in der Lage über das An- oder Ausschalten bereits vorhandener Proteine auf Veränderungen zu reagieren, ohne dass die Anzahl der Kopien der mRNA verändert wird. Eine weitere Möglichkeit besteht auch in der Stabilität der Proteine selbst.

Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzellen und ET-1 behandelten Zellen wurden für die PKCs  $\eta$  und  $\gamma$ , die PKD3 und die PLCs  $\beta 1$ ,  $\varepsilon$  und  $\gamma 2$  festgestellt. Die PE-Stimulation führte zu Änderungen in der Expression der PKCs  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\gamma$ , der PKD3, der PLCs  $\beta 1$  und  $\gamma 2$  und SERCA.

Die PLC $\beta$  ist wie bereits beschrieben an der  $G_q$ -vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Sie wird von  $G_{\alpha q}$  aktiviert und katalysiert anschließend die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub>. Es gibt vier verschiedene PLC $\beta$ -Varianten PLC $\beta 1$ -4, wobei die PLC $\beta 1$  hauptsächlich in der Großhirnrinde und im Hippocampus exprimiert ist (Homma *et al.*, 1989; Suh *et al.*, 2008).

Die Expression der PLC $\gamma 2$  ist nach der Expressionsstudie von Suh *et al.* (2008) dagegen hauptsächlich auf hämatopoetische Zellen beschränkt und ist an der Immunantwort beteiligt. Obwohl die Expression dieser Isoform in Kardiomyozyten nicht zu erwarten war, wurde sie hier detektiert. Die Schwankungen der PLC $\gamma 2$  vor allem nach ET-1 Stimulation sind sehr groß, was bislang nicht zu erklären ist.

Die PKD3 (in älteren Publikationen noch als PKC $\nu$  bezeichnet), gehört zu einer von drei Isoformen der PKDs. Von diesen drei Isozymen wurden in dieser Studie die PKD1 (ursprünglich als PKC $\mu$  bezeichnet) und die PKD3 analysiert, da diese

früher zu den PKCs gezählt wurden. Mittlerweile sind die PKDs als Unterfamilie der CaMK Superfamilie klassifiziert (Wang, 2006). Die PKD wird unter anderem durch G-Protein-gekoppelte Signale aktiviert. Dabei wird zum einen durch DAG-Bindung die Lokalisation beeinflusst. Zum anderen kommt es innerhalb dieses Signalweges zur Aktivierung von nPKCs, die wiederum die PKD aktivieren (Wang, 2006). Die PKD ist maßgeblich an der Erregungs-Transkriptions-Kopplung beteiligt, da sie die HDAC5 phosphoryliert und damit für deren Export aus dem Zellkern verantwortlich ist. Dadurch wird die inhibierende Wirkung dieses Proteins auf die Genexpression aufgehoben (Fu und Rubin, 2011). Eine mögliche Regulation der PKD auf Transkriptionsebene kann diesen Prozess daher ebenso beeinflussen. Da es speziell zur PKD1 Untersuchungen gibt, die eine Aktivierung nach Endothelin-1 Stimulation belegen (Guo *et al.*, 2011), ist es verwunderlich, dass die PKD1 hier nicht detektiert werden konnte. Möglicherweise war die Primerauswahl nicht optimal oder aber die Anzahl der Transkripte dieser Isoform in den Kardiomyozyten war zu gering. Eine Positivkontrolle hätte darüber Aufschluss geben können, wurde aber nicht gemacht.

Die PKC $\eta$  ist hauptsächlich in Epithelgewebe exprimiert und scheint dort eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zu spielen (Breitkreuz *et al.*, 2007). Eine mögliche Funktion in Herzmuskelzellen ist bislang ebenfalls nicht beschrieben.

Im Gegensatz dazu gibt es zahlreiche Publikationen zur PKC $\epsilon$  im Herzen. Demnach spielt diese Isoform im Herzen eine Rolle bei Fibrose, Hypertrophie und Herzversagen (Palaniyandi *et al.*, 2009). Da eine chronische Stimulation mit ET-1 zu Hypertrophie führen kann und auch die PKC $\epsilon$  an der Entstehung dieser pathologischen Veränderung beteiligt ist, scheint eine Regulation auch auf Transkriptionsebene durchaus sinnvoll. Aus den zeitlichen Änderungen lässt sich allerdings kein einheitliches Bild darstellen. Während die PKC $\epsilon$ -Expression nach ET-1 Stimulation an DIV0 im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht ist, sinkt sie an DIV1 und 3 unter Kontrollniveau, um an DIV6 wieder zu steigen. Solche Schwankungen (sowohl durch ET-1 als auch durch PE verursacht) wurden bei einigen der untersuchten Gene gefunden. Da, wie bereits dargestellt wurde, eine Regulation nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern vor allem auch durch die Aktivität der Proteine geschieht, können aus diesen Ergebnissen keine direkten

Rückschlüsse gezogen werden. Es steht lediglich fest, dass durch die hormonelle Stimulation Veränderungen im Transkriptionsmuster dieser Proteine ausgelöst wurden.

Die PKC $\gamma$  gehört zusammen mit den Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  zur Untergruppe der cPKCs, die in Anwesenheit von Phosphatidylserin von DAG und Ca<sup>2+</sup> aktiviert werden. Von den drei cPKCs besitzt die PKC $\gamma$  die höchste Ca<sup>2+</sup>-Affinität. Sie bindet wie die PKC $\beta$  drei Ca<sup>2+</sup>-Ionen, während die PKC $\alpha$  nur zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen komplexiert (Kohout *et al.*, 2002). Die PKC $\gamma$  ist ursprünglich als neuronale Isoform bekannt. Ihre Expression ist hauptsächlich auf Gehirn und Rückenmark beschränkt, wo sie an der Bildung und Funktion von Synapsen beteiligt ist (Saito und Shirai, 2002). Hinweise auf weitere, nicht-neuronale Funktionen der PKC $\gamma$  gibt es bislang keine. Es ist daher umso interessanter zu untersuchen, inwiefern die PKC $\gamma$  in Herzmuskelzellen an Prozessen beteiligt sein könnte, die durch die beiden Hormone ausgelöst werden.

Interessanterweise führte die ET-1 Stimulation zu einer Verringerung der Transkripte der PKC $\gamma$ , während die Zugabe von PE einen entgegengesetzten Effekt zur Folge hatte. PE führte ebenfalls zur Zunahme der SERCA-Expression. Dies war auch der einzige Fall, bei dem die Entwicklung beider Reihen (Kontrolle und Behandlung) gleich verlief. Das heißt, dass es jeweils keine Unterschiede zwischen Kontrolle und PE-Behandlung über die Kultivierungsdauer gab und die Entwicklung über die Zeit damit für beide Bedingungen gleich verlief. Bei allen anderen Genen konnte keine Richtung der Änderung angegeben werden. Es gab also generell keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Gene. Die C<sub>T</sub>-Werte lagen also nicht bei einer Bedingung signifikant höher oder niedriger als bei der anderen. Vielmehr konnten in der Charakteristik der Verteilungen signifikante Unterschiede detektiert werden. Das bedeutet, dass sich die Gesamtverläufe der Expressionswerte über die Zeitreihe (DIV0 bis DIV6) signifikant unterschieden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die chronische hormonelle Stimulation zahlreiche Veränderungen in der Expression einiger der analysierten Gene hervorrief. Bei den meisten dieser Gene führte sowohl ET-1 als auch PE zu

Veränderungen in der Transkriptionsrate, wobei die meisten Änderungen im Vergleich der zeitlichen Verläufe der Expressionswerte von DIV0 bis DIV6 detektiert wurden. Lediglich für SERCA und PKC $\gamma$  führte die PE-Zugabe zu einer systematisch höheren Expression, wobei die Stimulation mit ET-1 zu einer Verringerung der PKC $\gamma$ -Expression führte.

### 5.1.4 Ausblick

Diese entgegengesetzte Entwicklung für die PKC $\gamma$  war besonders interessant und wird daher in Zukunft noch auf Proteinebene analysiert werden. Da eine Beteiligung der PKC $\gamma$  an der Reaktion der Herzmuskelzellen auf die hormonelle Stimulation nicht erwartet wurde, wird diese Entwicklung in zukünftigen Experimenten weiter analysiert werden. Dabei kann die PKC $\gamma$ -Expression nach ET-1 und PE-Behandlung auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse untersucht werden. Sollten diese Experimente die erhaltenen Ergebnisse auf Proteinebene bestätigen, wäre dies eine vielversprechende Grundlage, den Effekt dieser Isoform genauer zu analysieren.

### 5.2 Effekt der PKC $\iota$ auf die Physiologie von Kardiomyozyten

In dieser Studie wurde die physiologische Funktion der PKC $\iota$  in adulten Kardiomyozyten der Ratte untersucht. Die PKC $\iota$  bildet zusammen mit der PKC $\zeta$  die Subfamilie der atypischen PKCs. In vielen bisherigen Untersuchungen wurde nur die PKC $\zeta$  berücksichtigt oder beide Isoformen zusammengefasst. Untersuchungen, die sich spezifisch auf die Funktion der PKC $\iota$  beziehen, befassen sich zum Beispiel mit deren Effekt bei der Entstehung und Progression verschiedener Krebsarten (unter anderem Regala *et al.*, 2009; Scotti *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011), der Polarisierung von Zellen (Noda *et al.*, 2001), sowie der Entwicklung multizellulärer Organismen (Suzuki *et al.*, 2003).

Zwar wurde die Expression der PKC $\iota$  bereits in Kardiomyozyten beschrieben, jedoch gibt es bislang keinerlei Untersuchungen zur Verteilung oder einer möglichen Funktion dieser Isoform im Herzen.

Daher wurden für diese Untersuchungen Viren hergestellt, die die Sequenzinformation der PKC $\iota$  mit einem C-terminalen GFP enthalten. Nach Transduktion von Kardiomyozyten exprimierten diese das Protein, was fluoreszenzmikroskopisch bestätigt wurde. Um spezifische Effekte auf den Aktivitätszustand der PKC $\iota$  zurückführen zu können, wurden zusätzlich Viren mit einer konstitutiv-aktiven sowie einer dominant-negativen Mutante des Proteins hergestellt. Damit wurde die Möglichkeit geschaffen, die Lokalisation der PKC $\iota$  in Kardiomyozyten in Abhängigkeit ihrer Aktivität zu beobachten, sowie physiologische Effekte direkt auf den Aktivitätszustand der Kinase zu beziehen.

#### 5.2.1 Lokalisation der PKC $\iota$ in Ratten-Kardiomyozyten

Im Western Blot und durch immunzytochemische Analysen wurde nachgewiesen, dass die PKC $\iota$  in adulten Ratten-Kardiomyozyten exprimiert wird. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers wurde in einer früheren Studie bereits nachgewiesen (Stross *et al.*, 2009), was hier mit Lysaten aus isolierten Kardiomyozyten im

Western Blot bestätigt werden konnte. Der Western Blot zeigte nur eine Bande auf der Höhe, die der Größe der PKC $\iota$  entsprach. Das in der Immunfluoreszenzfärbung entstandene Muster konnte daher eindeutig auf die Verteilung der PKC $\iota$  in der Zelle zurückgeführt werden. Die immunzytochemische Färbung der Zellen bedurfte einiger Optimierung und konnte selbst dann nur sehr schwach detektiert werden. Hierfür wurden verschiedene Antikörper-Verdünnungen ausgetestet. Die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper erfolgte letztendlich in einer 1:10 Verdünnung in PBS über mehrere Stunden. Trotz dieser hohen Antikörperkonzentration wiesen nur wenige der behandelten Zellen eine für die Detektion ausreichende Fluoreszenz auf. Da für die Fluoreszenzaufnahmen eine hohe Laserleistung und eine lange Belichtungsdauer notwendig waren, wurde ein DyLight 649-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. Dieser besitzt seinen Anregungspeak bei 652 nm und seinen Emissionspeak bei 670 nm. Bei kürzeren Wellenlängen treten gerade bei hoher Laserleistung oft Probleme mit Autofluoreszenz auf, die schwache Signale überstrahlen kann und die Aufnahmen dadurch unbrauchbar macht. Bei dieser Wellenlänge gibt es diese Problematik nicht. Zusätzlich bleicht der DyLight-Farbstoff nur sehr langsam, was eine lange Belichtungsdauer ermöglichte.

Eine schlechte Zugänglichkeit des Epitops für den Antikörper könnte eine Erklärung für die schwache Färbung sein. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Expressionsrate der PKC $\iota$  möglicherweise sehr gering ist. Wenn die PKC $\iota$  nur in geringer Kopienzahl in den Kardiomyozyten vorliegt, könnte dies darauf hindeuten, dass die Kinase eine wichtige Rolle in der Zelle übernimmt, die einer strengen Regulation bedarf. Dass die PKC $\iota$  bei der qPCR-Analyse mit der dort eingesetzten relativ geringen RNS-Menge nicht detektiert werden konnte, unterstützt diese Theorie.

Das Verteilungsmuster, das aus der Immunfluoreszenz hervorging, zeigte eine Querstreifung der Zelle, wie sie auch beim Anfärben von Z-Scheibenproteinen entsteht. Eine Lokalisation der PKC $\iota$  an den Z-Scheiben kann ein Hinweis darauf sein, dass hier Substrate lokalisiert sind. Hierfür existieren bereits Untersuchungen über die atypische PKC $\zeta$ , die der PKC $\iota$  sehr ähnlich ist. Die Sequenzhomologie zwischen beiden Proteinen beträgt 72 %, wobei die Kinasedomänen zu 86 % und

Teile der regulatorischen Regionen zu 69 % identisch sind (Akimoto *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass die PKC $\zeta$  an den Myofilamenten adulter ventrikulärer Ratten-Kardiomyozyten lokalisiert ist. Nach Aktivierung der PKC $\zeta$  konnte sowohl eine erhöhte Translokation zu den Z-Scheiben, als auch eine verstärkte Desmin-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Wu und Solaro, 2007). Ob die beiden atypischen PKCs in Kardiomyozyten an denselben Signalwegen beteiligt sind oder ganz unterschiedliche oder gar gegensätzliche Aufgaben übernehmen, ist bis jetzt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

So üben beispielsweise die beiden nPKCs  $\delta$  und  $\varepsilon$  einen parallelen Effekt bei der Entstehung von Hypertrophie im Herzen aus, übernehmen aber entgegengesetzte Aufgaben was den Schutz vor Ischämie-induzierten Schäden betrifft (Chen *et al.*, 2001). Dagegen wird häufig eine kompensatorische Wirkung der beiden atypischen PKCs aufgrund ihrer gemeinsamen Merkmale vermutet (Suzuki *et al.*, 2003). Inwiefern dies in Kardiomyozyten der Fall ist, bleibt aufzuklären. Zu möglichen Substraten der PKC $\iota$  in Herzmuskelzellen gibt es bislang keinerlei Untersuchungen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse einzelner Studien ist zu beachten, dass viele der kommerziell erhältlichen Antikörper nicht zwischen den beiden atypischen Isoformen unterscheiden. Ob also in Einzelfällen Effekte tatsächlich nur spezifisch auf eines der atypischen PKC Isozyme zurückzuführen sind, ist fraglich. Beim Ausschalten eines der beiden Isozyme, wie es bei Knock-out- (KO) Mäusen der Fall ist oder auch beispielsweise durch RNS-Interferenz möglich wäre, ist eine Kompensation durch das andere Isozym denkbar. Dadurch können mögliche Effekte verschleiert werden. In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt, der auf der Expression von konstitutiv-aktiven und dominant-negativen Mutanten der PKC $\iota$  beruht. Prinzipiell sind aber auch dabei kompensatorische Effekte möglich. Der Vorteil dieses Ansatzes war, dass nicht nur die „loss of function“-Situation, sondern auch der „gain of function“-Effekt untersucht werden konnte, wodurch ein direkter Vergleich gezogen werden konnte. Zudem ermöglichte die Fusion des GFP an die PKC $\iota$ -Varianten nicht nur die Analyse der Lokalisation in den Herzmuskelzellen, sondern auch die Auswahl positiv transduzierter Zellen für die Kalzium- und Sarkomerlängenmessungen.

Da im hier gewählten Ansatz das Protein nicht ausgeschaltet wurde, sondern in erhöhter Auflage in inaktiver Form in die Zellen eingeschleust wurde, ist eine erhöhte endogene Produktion der PKC $\iota$  oder  $\zeta$  eher unwahrscheinlich. Da es sich um einen akuten Eingriff handelte, war eine spontane Anpassung etwa über Veränderungen in der Aktivität endogener Proteine in den isolierten Zellen möglich. Allerdings war die Expression der so eingeschleusten Gene stark erhöht, weshalb ein Effekt endogen exprimierter Proteine wohl eher vernachlässigt werden konnte. Eine Anpassung während der Entwicklung des Organismus, wie sie bei KO-Mäusen auftreten kann, war bei diesem Ansatz ebenfalls ausgeschlossen.

Dass die Aufgaben und Effekte der PKC $\iota$  bislang so wenig untersucht sind, liegt unter anderem an der Tatsache, dass PKC $\lambda$  KO-Mäuse (das Maushomolog zur PKC $\iota$  wird als PKC $\lambda$  bezeichnet) bereits im frühen Embryonalstadium lethal sind, was wahrscheinlich auf Defekte in der Zellpolarität zurückzuführen ist (Soloff *et al.*, 2004). PKC $\zeta$  KO-Mäuse hingegen sind lebensfähig und kommen entsprechend den mendelschen Regeln zur Welt (Leitges *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen gaben erste Hinweise darauf, dass die beiden atypischen PKCs *in vivo* unterschiedliche und spezifische Funktionen haben können und eine Kompensation zumindest nicht grundsätzlich zu erwarten ist.

Zur Untersuchung der Funktion der PKC $\lambda$  in den Herzmuskelzellen wäre aufgrund der Lethalität der PKC $\lambda$  KO-Mäuse ein induzierbarer herzspezifischer Knock-out notwendig. Es existieren bereits Mäuse, die gewebespezifische KOs der PKC $\lambda$  enthalten. So gibt es neben leberspezifischen und pankreatischen betazellspezifischen KO-Mäusen (Matsumoto *et al.*, 2003 und Hashimoto *et al.*, 2005) auch muskelspezifische PKC $\lambda$  KO-Mäuse (Farese *et al.*, 2007). Die Expression der aPKCs ist in den homozygoten muskelspezifischen PKC $\lambda$  KO-Mäusen um etwa 80 % reduziert. Es wurde nicht darauf eingegangen, inwiefern die übrigen 20 % auf die PKC $\zeta$  oder die PKC $\lambda$  zurückzuführen sind. In dieser Studie wurde gezeigt, dass der Insulin-stimulierte Glukosetransport im Herzmuskel dieser Mäuse merklich beeinträchtigt ist. Trotz dieser beobachteten Effekte ist es dennoch grundsätzlich denkbar, dass während der Entwicklung der Mäuse einige Funktionen durch andere Signalwege übernommen werden und die Mäuse



dadurch in der Lage sind, sich an die veränderten Bedingungen anzupassen. Ein induzierbarer Knock-out wäre eine Möglichkeit solche Effekte zu umgehen. Untersuchungen speziell an den Herzmuskelzellen und zum Kontraktionsverhalten wurden bei dieser Studie von Farese *et al.* (2007) nicht durchgeführt.

Zur Untersuchung des Proteins *in vivo* wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt. Die im Labor etablierte Methode zur Isolation und Kultivierung adulter Kardiomyozyten der Ratte ermöglichte das Einschleusen von Genen über adenovirale Vektoren (Viero *et al.*, 2008). Aufgrund der Fusion des GFP an die PKC $\iota$  konnte durch Fluoreszenzmikroskopie die Expression verfolgt und die Lokalisation der Kinase in den adulten Kardiomyozyten beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass die PKC $\iota$  sowohl am F-Aktin, als auch an den Z-Scheiben und in den Zellkernen lokalisiert war. Die Lokalisation an den Z-Scheiben stimmte mit den Immunfluoreszenzaufnahmen der endogenen PKC $\iota$  überein. Eine Analogie gab es auch zur atypischen PKC $\zeta$ , die an den Myofilamenten lokalisiert ist und nach Aktivierung verstärkt an die Z-Scheiben transloziert (Wu und Solaro, 2007).

Eine Beteiligung der beiden atypischen PKC Isozyme an der Ras-induzierten Reorganisation des F-Aktinzytoskeletts wurde in NIH3T3 Zellen nachgewiesen (Überall *et al.*, 1999). Dabei wurde ein Modell für einen Signalweg vorgeschlagen, in dem die PKC $\iota$  nachgeschaltet von Ras, aber vorgeschaltet der PI3K und Rac1 liegt, während die PKC $\zeta$  nachgeschaltet von Rac-1 in diesem Signalweg agiert, was zur Reorganisation der Aktinfilamente führt (Überall *et al.*, 1999; Hellbert *et al.*, 2000). Eine durch die Expression der PKC $\iota$  hervorgerufene Veränderung des F-Aktinmusters wurde in dieser Arbeit in den adulten Kardiomyozyten nicht beobachtet. Nach Transduktion der Herzmuskelzellen mit den verschiedenen PKC $\iota$ -Varianten zeigte sich bei der Anfärbung des F-Aktins mit Phalloidin keine außergewöhnliche Verteilung. Interessant ist allerdings die Tatsache, dass die PKC $\iota$  in diesem vorgeschlagenen Signalweg zur Aktivierung von Rac1 führt. Rac1 gehört zur Familie der Rho-GTPasen und wird sowohl mit der Entstehung von Hypertrophie (Satoh *et al.*, 2006), als auch mit der Pathogenese von Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (Adam *et al.*, 2007). Es wird daher interessant sein zu analysieren, ob die PKC $\iota$  in Kardiomyozyten ebenfalls zu einer

Aktivierung von Rac1 führt. Eine weitere Möglichkeit der Interaktion zwischen PKC $\alpha$  und Rac wurde bei der Polarisierung von Säugerzellen beschrieben (Noda *et al.*, 2001). Hierbei agiert das Protein Par6 als Adapterprotein. Es handelt sich dabei um ein Protein, das für die asymmetrische Zellteilung notwendig ist und das verschiedene Domänen besitzt, mit denen es mit anderen Proteinen interagieren kann. In dem beschriebenen Fall dient Par6 als Adapter bei der Bildung eines ternären Komplexes zwischen den Rho-GTPasen Rac und Cdc42 mit den aPKCs *in vitro* und *in vivo* (Noda *et al.*, 2001).

Um den physiologischen Effekt der PKC $\alpha$  in den Ratten-Kardiomyozyten untersuchen zu können, ist es notwendig die Kinase spezifisch an- und abzuschalten. Eine Aussage über den Grad der Aktivierung der endogenen und der viral eingebrachten PKC $\alpha$  in den Herzmuskelzellen war nicht möglich. Da für die PKC $\alpha$  keine spezifischen Regulatoren kommerziell erhältlich sind, war eine spezifische Aktivierung der PKC $\alpha$  *in vivo* ebenso wenig möglich, wie eine spezifische Inhibition. Als Aktivatoren kommen grundsätzlich Lipide wie Phosphatidylserin, PIP3, Ceramid oder Arachidonsäure in Frage, für die in diversen Untersuchungen eine Aktivierung der aPKCs nachgewiesen wurde (Nakanishi und Exton, 1992; Nakanishi *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 2007). Diese Faktoren wirken sich aber ebenso auf andere Signalwege und Proteine aus und sind wenig spezifisch. Zudem sind Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen wahrscheinlich, wobei über die PKC $\alpha$ -Aktivierung in Kardiomyozyten noch keine Erkenntnisse vorliegen. Die aPKCs werden generell über den PI3-Kinaseweg aktiviert (Akimoto *et al.*, 1996). Das Fehlen von Rezeptoren in der Membran der Kardiomyozyten für Wachstumsfaktoren wie EGF oder NGF für die eine Aktivierung der aPKCs in Zelllinien gezeigt wurde (Akimoto *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997), schloss diese Art der Aktivierung aus. Ein solcher Eingriff wäre außerdem zu unspezifisch gewesen, um nachfolgende Effekte direkt einer einzelnen PKC zuordnen zu können.

Daher wurden ausgehend von dem wildtyp-Protein Mutationen im Molekül eingefügt, die die Expression einer konstitutiv-aktiven, sowie einer dominant-negativen Variante des Proteins zur Folge hatten. Die Funktionalität der Mutanten wurde in einem Kinase-Aktivitätstest nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt,

dass die dominant-negative Form tatsächlich nur eine sehr geringe Restaktivität aufwies und auch nicht durch den Aktivator Phosphatidylserin aktiviert werden konnte. Die wt-Form wies ohne PS bereits eine gewisse Aktivität auf, die durch Zugabe des Aktivators gesteigert werden konnte. Die konstitutiv-aktive Variante zeigte eine stark erhöhte Aktivität, die durch PS nicht mehr erhöht wurde. Um eine hohe Verlässlichkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sollten die Proben eine 5 bis 10 mal höhere Radioaktivität aufweisen als die Kontrollreaktionen (Hastie *et al.*, 2006), was hier erreicht wurde.

Die Aktivitätstests wurden mit Zellextrakten transfizierter HEK Zellen durchgeführt. Ein Rückschluss auf die Aktivität der dominant-negativen und der konstitutiv-aktiven Mutante in Kardiomyozyten nach adenoviralem Gentransfer war möglich, da die inaktive Mutante tatsächlich nicht mehr aktiviert werden konnte und die Aktivität der aktiven Mutante nicht mehr steigerungsfähig zu sein schien. Die Aktivität der wildtyp-PKC $\iota$  in Kardiomyozyten konnte durch dieses Experiment allerdings nicht abgeschätzt werden, da diese von zellulären Faktoren, wie zum Beispiel dem Aktivator Phosphatidylserin abhängt. Die Aktivitätstests konnten nicht mit Lysaten von Kardiomyozyten durchgeführt werden, da es nicht möglich war ausreichend Proteinextrakt für die Immunpräzipitationen zu bekommen und dies sehr viel Virus verbraucht hätte.

Eine erste Beurteilung über die Aktivität konnte allerdings aufgrund der Lokalisationsstudien getroffen werden. Die Lokalisation der CA-Mutante zeigte starke Ähnlichkeit mit der wt-PKC $\iota$ . Die aktive Kinase kolokalisierte ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett und dem Z-Scheibenprotein  $\alpha$ -Aktinin. Als Unterschied war die starke Fluoreszenz in den Zellkernen der Kardiomyozyten festzustellen. Zwar wurde die wt-PKC $\iota$  auch in den Kernen gefunden, allerdings bei weitem nicht so stark wie die aktive PKC $\iota$ . Die Aktivierung der PKC $\iota$  schien daher zu einer Translokation in die Zellkerne zu führen. Eine Translokation der PKC $\zeta$  zum Zellkern wurde in PC12 Zellen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren beobachtet, die den PI3K-Weg aktivieren (Zhou *et al.*, 1997; Neri *et al.*, 1999), durch den auch die PKC $\iota$  aktiviert wird. Für die PKC $\zeta$  wurde zudem eine Translokation vom Zytosol zum Zellkern während Ischämie gezeigt (Mizukami *et al.*, 1997; Mizukami *et al.*, 2000). Die PKC $\iota$  besitzt sowohl ein Kernlokalisations-

Signal (NLS) als auch ein Kernexport-Signal (NES) (Perander *et al.*, 2001). Eine Translokation des Proteins zwischen Zytosol und Zellkern ist daher in beide Richtungen möglich. Die Anreicherung der Kinase in aktiviertem Zustand in den Zellkernen könnte auf einen erhöhten Kernimport im aktiven Zustand hindeuten. Ebenso ist aber auch ein abgeschwächter Export möglich, für den Fall, dass die Kinase permanent zwischen Zytosol und Kern wandert. Eine Rolle der aktiven PKC $\iota$  bei der Transkription wäre eine mögliche Erklärung für diese Art der Regulation und ist durchaus denkbar. In Zelllinien wurde bereits ein Signalweg identifiziert, der die PKC $\iota$  beinhaltet und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führt (Sanz *et al.*, 1999).

Die Lokalisation der DN-Mutante unterschied sich dagegen deutlich von der der beiden anderen Varianten. Die Kolokalisation mit dem F-Aktin war gänzlich verschwunden. Ebenso konnte keine Kolokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war eine verstärkte Präsenz an der Zellmembran zu erkennen. Zudem wurde auch bei der inaktiven Variante eine Anreicherung in den Zellkernen festgestellt, was zunächst nicht unbedingt zu erwarten war, nachdem die Aktivierung der PKC $\iota$  ebenfalls zu einer verstärkten Präsenz in den Zellkernen führte.

Eine Erklärung hierfür liefern Experimente von Perander *et al.* in HEK- und HeLa-Zellen. Hier wurde die wt-PKC $\iota$  hauptsächlich im Zytoplasma, eine Fraktion aber auch im Zellkern detektiert. Eine dominant-negative Variante mit einer Punktmutation in der ATP-Bindestelle (wie sie auch hier verwendet wurde) war dagegen im Nukleus lokalisiert (Perander *et al.*, 2001). Innerhalb der Aminosäuresequenz der PKC $\iota$  wurden sowohl ein NLS, als auch ein NES gefunden, wobei das NLS gegenüber dem NES dominant ist, sofern beide Signale exponiert sind. Es wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Akkumulation im Zellkern nicht direkt mit dem Aktivitätsstatus der Kinase korreliert. Vielmehr wurden intramolekulare Interaktionen zwischen der katalytischen Domäne und der Pseudosubstratdomäne als inhibitorische Faktoren für die Kernlokalisierung ausgemacht. Diese Interaktion sorgt dafür, dass im wt-Protein das NLS nicht zugänglich ist. Durch Einfügen der Punktmutation in der ATP-Bindestelle kommt es zu einer Konformationsänderung im Protein, die das NLS zugänglich macht

und damit eine Akkumulation der DN-Mutante im Kern zur Folge hat. Ebenso wurde auch die Lokalisation einer CA-Mutante durch Punktmutation in der Pseudosubstratsequenz (A129E) hauptsächlich im Zellkern von HeLa Zellen detektiert, was auf die Auflösung der intramolekularen Interaktion zwischen der PS-Sequenz und der katalytischen Domäne zurückgeführt werden konnte.

Die Beobachtung, dass die DN-PKC $\alpha$  in den Herzmuskelzellen hauptsächlich in den Kernen detektiert wurde, untermauert die Theorie von Perander *et al.* (2001), dass durch die Auflösung der Interaktion der PS-Domäne mit der katalytischen Domäne ein NLS freigelegt wurde, das zur Kernlokalisation der DN-Mutante führte. Die zunächst widersprüchlich erscheinende Anreicherung der CA-Mutante in den Kernen konnte ebenfalls durch die, mit der Mutation der Pseudosubstratdomäne verbundene, Konformationsänderung erklärt werden.

In den HEK Zellen, mit denen in der vorliegenden Arbeit die Aktivitätstests durchgeführt wurden, war auch ohne Zugabe des Aktivators Phosphatidylserin eine gewisse Aktivität der wt-PKC $\alpha$  vorhanden. Aufgrund der Ergebnisse der Lokalisationsexperimente war zu vermuten, dass die wt-PKC $\alpha$  in Kardiomyozyten zu einem großen Teil in aktiver Form vorlag. Abgesehen von der Akkumulation beider Mutanten im Kern wies die Lokalisation der wt-PKC $\alpha$  wesentlich mehr Gemeinsamkeiten mit der konstitutiv-aktiven, als mit der dominant-negativen Variante auf. Während die DN-Mutante neben der Kernlokalisation ausschließlich an der Membran detektiert wurde, zeigten die wt- und die CA-Varianten eine Lokalisation am Zytoskelett.

Es sah so aus, als würde eine Aktivierung der PKC $\alpha$  zur Translokation sowohl an die Myofilamente, als auch zu den Z-Scheiben führen. Die Lokalisation der aktiven Form an den kontraktilen Elementen der Herzmuskelzellen legte die Vermutung nahe, dass es durch die Anwesenheit der PKC $\alpha$  ein aktives Eingreifen ins Kontraktionsgeschehen geben könnte. Eine Untersuchung des Kontraktionsverhaltens und der zugrundeliegenden Prozesse sollte darüber Aufschluss geben.

Eine Membranlokalisation wurde bei allen Aktivitätszuständen gefunden, wobei speziell die DN-Mutante außer im Zellkern ausschließlich an der Membran detektiert wurde. Hier scheint es einen eindeutigen Unterschied zu anderen PKC

Isozymen zu geben. Eine Membrantranslokation der c- und nPKCs wird als Indikator für die Aktivierung der Kinase angesehen. Diese Isozyme werden an der Membran durch DAG-Bindung endgültig in einen aktiven Zustand versetzt, was wie bereits beschrieben, bei den aPKCs aufgrund der atypischen C1-Domäne nicht möglich ist.

### **5.2.2 Einfluss der PKC $\iota$ auf das Kalzium- und Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten**

Um den Einfluss der PKC $\iota$  auf die Kalziumtransienten bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung zu untersuchen, wurden Kalziummessungen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2 durchgeführt. Um möglichst „physiologische“ Bedingungen zu konstruieren, wurden die Messungen bei 37 °C durchgeführt.

Insgesamt wurde festgestellt, dass die PKC $\iota$  keinen Einfluss auf die diastolische Kalziumkonzentration (Kalziumbasislinie) und die Dauer der Kalziumtransienten hatte. Signifikante Änderungen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen wurden in der Amplitude der Kalziumtransienten im „Steady State“ ermittelt. Da Herzmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen im Organismus permanent kontrahieren, ist der „Steady State“ als physiologischer Zustand zu betrachten, während das „Post Rest“-Verhalten eine künstlich herbeigeführte Situation darstellt.

Die Expression der konstitutiv-aktiven PKC $\iota$ -Variante führte zu einer signifikant niedrigeren Amplitude der Kalziumtransienten, während die Amplitude der Zellen mit der dominant-negativen Variante deutlich erhöht war. Die Amplituden der Zellen, die die wt-Kinase exprimierten, lag erwartungsgemäß zwischen denen der Mutanten und war gegenüber den Kontrollzellen unverändert. Es wurde also eine bidirektionale Regulation der Ca<sup>2+</sup>-Transienten durch die PKC $\iota$  festgestellt. Dass die Erhöhung der Amplitude bei der DN-Mutante nicht signifikant zu den Kontrollbedingungen und der Amplitude der wt-PKC $\iota$  Zellen war, könnte sich mit höheren Zellzahlen ändern. Ein kompensatorischer Eingriff der PKC $\zeta$  wäre ebenfalls möglich. Häufig kann der Ausfall eines Proteins durch ein anderes

kompensiert werden. Ein solcher Effekt ist aufgrund der Ähnlichkeit beider aPKCs denkbar.

Die Ergebnisse der Kalziummessungen zeigten, dass aus der Expression der wt-Kinase keine Veränderungen im Kalziumverhalten der Kardiomyozyten resultierten. Die zusätzlichen Proteine wurden in der Zelle so reguliert, dass sich bei den beobachteten Parametern keine Veränderungen zu untransduzierten Zellen ergaben. Es ist davon auszugehen, dass auch bei der stark erhöhten Expression der PKC $\iota$  die Regulation gewährleistet war, sodass das Niveau an aktiven beziehungsweise inaktiven Proteinen aufrecht erhalten blieb.

Es ist festzuhalten, dass die Infektion der Herzmuskelzellen mit den Adenoviren an sich und die daraus resultierende Proteinexpression den Kalziumhaushalt und das Kontraktionsverhalten nicht beeinflussten. Die aufgetretenen Änderungen in der Höhe der Kalziumtransienten konnten daher eindeutig auf die PKC $\iota$  und ihren Aktivitätszustand zurückgeführt werden.

Interessanterweise führte die Erhöhung beziehungsweise Verringerung der Amplitude der Kalziumtransienten nicht gleichzeitig zu einer Veränderung in der Dauer der Transienten. In diversen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung/Verringerung der Ca $^{2+}$ -Amplitude und einer Verkürzung/Verlängerung der Transientendauer festgestellt (Siedlecka *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Es gibt allerdings auch Studien, bei denen eine Verringerung der Kalziumamplitude ebenfalls keine gleichzeitige Verlängerung der Transientendauer zur Folge hatte, was darauf zurückgeführt wurde, dass die SERCA mit unveränderter Kapazität und Aktivität funktioniert (Wang *et al.*, 2010). Die Transientendauer reflektiert hauptsächlich die SERCA-Aktivität, da deren Effizienz sehr viel höher ist, als die des NCX und in Ratten-Kardiomyozyten direkt nach der Kontraktion mehr als 90 % des Kalziums über die SERCA-Pumpe zurück ins SR transportiert wird (Wang *et al.*, 2008). Dass durch die Expression der verschiedenen PKC $\iota$ -Varianten keine Änderungen in der Kalziumtransientendauer beobachtet wurden, sprach also für eine unveränderte Aktivität der „Ca $^{2+}$ -Removal“-Prozesse, insbesondere der SERCA-Pumpe. Als Maß

hierfür wurde die Dauer der Transienten gemessen, bei der die Amplitude um 80 % zurückgegangen war.

Aus der Gegenüberstellung der einzelnen Amplituden und dem Expressionsniveau der PKC $\iota$ -Varianten (Abbildung 38) ging hervor, dass die Amplitude insgesamt für alle eingeschleusten Proteine in keinem linearen Zusammenhang mit der Proteinmenge stand, was an den sehr niedrigen R<sup>2</sup>-Werten ersichtlich ist, die alle kleiner als 0,1 waren. Um eine verlässliche Aussage über eine lineare Relation treffen zu können, sollte der R<sup>2</sup>-Wert nicht kleiner als 0,5 sein, was für alle Bedingungen sehr deutlich unterschritten wurde. Trotzdem konnten aus der Darstellung einige Rückschlüsse gezogen werden. Da die Effekte mit einer höheren Expressionsrate nicht gesteigert auftraten, schien eine Sättigung des Effekts erreicht, wobei schon eine geringe Expression der einzelnen Varianten ausreichte, um diese Effekte zu induzieren. Dass der Unterschied der dominant-negativen Mutante zu den Kontrollzellen und den Zellen mit der wt-PKC $\iota$  nicht signifikant ausfiel, lag vermutlich nicht am Expressionsniveau der inaktiven Kinase in den Zellen, sondern wahrscheinlich an einer zu geringen Anzahl gemessener Zellen (n=33). Möglich wäre auch hier wieder ein Kompensationseffekt durch die PKC $\zeta$ .

Es wird zusätzlich deutlich, dass die CA-Variante insgesamt eine geringere Fluoreszenz und damit eine geringere Expression aufwies, als die anderen Proteine (Abbildung 17), obwohl im Western Blot die höchste Expression im Vergleich zur endogenen PKC $\iota$  gezeigt wurde (Abbildung 14). Ein Vergleich der Expression endogener PKC $\iota$  zwischen den Proben konnte aufgrund der nicht spezifizierten Proteinmenge, die in den Western Blot eingesetzt wurde, nicht gezogen werden. Die Expression der konstitutiv-aktiven Variante könnte aber zu einer Regulierung der Expression der endogenen PKC $\iota$  geführt haben, die dadurch in geringerer Kopienzahl in der Zelle vorkam, was die Unstimmigkeiten zwischen beiden Ergebnissen erklären würde. Zudem war der Effekt der CA-PKC $\iota$  auf die Kalziumamplitude sehr homogen im Vergleich zu den anderen Bedingungen und wies am ehesten von allen noch eine Tendenz zur Linearität auf.



In vielen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen wurde ein paralleler Zusammenhang zwischen der Höhe der Kalziumtransientenamplitude und der Sarkomerverkürzung bei der Kontraktion der Herzmuskelzellen festgestellt (Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Siedlecka *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2006; Schaeffer *et al.*, 2009).

Daher wurden zusätzlich Sarkomerlängenmessungen durchgeführt, um festzustellen, ob die Expression der PKC $\iota$ -Varianten sich nicht nur auf die Kalziumamplitude, sondern auch auf die Kontraktionsstärke der Muskelzellen auswirkt. Es gibt viele Gründe für eine Veränderung der Ca $^{2+}$ /Kontraktions-Beziehung, wie zum Beispiel der pH-Wert, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), einen veränderten Kalziumeinstrom durch die L-Typ Kalziumkanäle, etc. Veränderungen in der Amplitude der Kalziumtransienten könnten zum Beispiel auf eine Veränderung des SR-Kalziumgehaltes oder auch auf eine veränderte Sensitivität der kontraktilen Elemente für Kalzium bei gleichem Kalziumausstrom aus dem SR zurückzuführen sein.

Beim Kontraktionsverhalten konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Zellen, die die unterschiedlichen PKC $\iota$ -Varianten exprimierten, ausgemacht werden. Eine Erhöhung/Verringerung der Ca $^{2+}$ -Transientenamplitude führte in diesem Fall also nicht gleichzeitig zu einer stärkeren/schwächeren Kontraktion. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Affinität der kontraktilen Elemente für Kalzium durch die PKC $\iota$  verändert wurde und nicht eine veränderte Ca $^{2+}$ -Konzentration für die Unterschiede verantwortlich war. Dazu passen auch die Ergebnisse, dass die „Ca $^{2+}$ -Removal“-Prozesse für alle Bedingungen gleich schnell waren. Eine veränderte Affinität der kontraktilen Elemente könnte durch Phosphorylierung beteiligter Proteine durch die PKC $\iota$  zustande kommen. Dies stünde im Einklang mit den Ergebnissen zur Lokalisation der einzelnen Varianten, da die aktive Kinase an Elementen des kontraktilen Apparates lokalisiert war, während die inaktive Kinase hier kaum detektiert wurde.

Diverse Untersuchungen belegen beispielsweise, dass die Phosphorylierung von kardialen TnI Veränderungen in der Ca $^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente zur Folge hat. Es wurde gezeigt, dass die PKA- und PKD-abhängige Phosphorylierung der

Serinreste 23 und 24 zur Verringerung der Sensitivität der Myofilamente führt, während die Phosphorylierung von Threonin 149 durch PAK3 einen entgegengesetzten Effekt hat (Burkart *et al.* 2003; Haworth *et al.*, 2004; Layland *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von Tnl durch PKC Isozyme und mögliche Auswirkungen auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente wird kontrovers diskutiert, wobei Pi *et al.* (2003) einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von Tnl an den PKC-Phosphorylierungsstellen Serin 43 und 45 und/oder Threonin 144 und einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente gezeigt hat.

Für die Zellen, mit denen die Kontraktionsmessungen durchgeführt wurden, lagen keine detaillierten Informationen über die Expressionsniveaus der einzelnen Varianten vor. Hier konnte lediglich darauf geachtet werden, dass die ausgewählten Zellen eine deutliche Fluoreszenz aufwiesen. Da an diesem Mikroskopaufbau die Aufnahme von Fluoreszenzbildern nicht möglich war, konnte keine Beziehung zwischen der Fluoreszenz und den Messwerten hergestellt werden. Es wäre insgesamt wünschenswert, die Kalzium- sowie die Kontraktionsmessungen gleichzeitig an denselben Zellen durchzuführen. Dadurch könnten direkte Rückschlüsse auf einen eventuell doch bestehenden Zusammenhang zwischen Kalziumamplitude und Sarkomerverkürzung getroffen werden. Ein paralleler Effekt zwischen beiden Parametern ist nach den gezeigten Ergebnissen nicht zu erwarten. Dennoch wäre es aussagekräftiger beides an den gleichen Zellen zu messen, um diesen Zusammenhang eindeutig ausschließen zu können.

Im Western Blot wurde gezeigt, dass an Tag 3, an dem auch die Experimente durchgeführt wurden, die Konzentration der adenoviral exprimierten Proteine in den Zellen deutlich höher war, als die der endogenen Kinase, sodass ein Beitrag der endogenen PKC $\alpha$  vernachlässigbar war. Es ist allerdings zu erwähnen, dass der Western Blot einen Durchschnittswert aller Zellen bildete, wobei für die Versuche nur diejenigen Zellen ausgewählt wurden, die anhand ihrer Fluoreszenz deutlich identifiziert werden konnten. Untransduzierte oder nur schwach exprimierende Zellen wurden nicht für die Kalzium- und Kontraktionsmessungen verwendet. Wie viel höher die Expressionsrate in den einzelnen Zellen dann tatsächlich war, konnte nicht festgestellt werden. Hierzu wären Einzelzellmessungen notwendig gewesen, die entweder auf mRNS- (qPCR) oder auf

Proteinebene einen direkten Vergleich ermöglicht hätten. Auf jeden Fall lag sie aber über den hier erhaltenen Durchschnittswerten. Die Auswahl von Zellen anhand ihrer Fluoreszenz und eine Angleichung der Ergebnisse aus den Messungen auf die Helligkeit beziehungsweise das Expressionsniveau der einzelnen leuchtenden Zellen war daher genauer und für diese Art von Experimenten besser geeignet. Der wesentlich größere Unterschied im Expressionsniveau der CA-Mutante und der endogenen PKC $\iota$  im Gegensatz zu den beiden anderen Varianten könnte an einer deutlich besseren Transduktionseffizienz dieses Virus gelegen haben. Wahrscheinlicher ist allerdings eine Herabregulierung der Expression endogener PKC $\iota$  bei adenoviral vermittelter Expression der CA-PKC $\iota$ . Auf die möglicherweise strikte Regulierung der PKC $\iota$  in der Zelle wurde bereits eingegangen.

### 5.2.3 Ausblick

Um eine genauere Aussage über den Zusammenhang von Kalzium- und Kontraktionsverhalten bei Expression der PKC $\iota$ -Varianten treffen zu können, soll ein Versuchsaufbau konstruiert werden, der es ermöglicht beide Messungen parallel an denselben Zellen durchzuführen. Dadurch könnte eine sicherere Aussage darüber getroffen werden, ob nicht eventuell doch ein paralleler Effekt im Kontraktionsverhalten auftritt. Dies ist zwar nach den bisherigen Ergebnissen nicht zu erwarten, aber auch nicht grundsätzlich auszuschließen.

Ein interessanter Aspekt wird auch die Untersuchung einer möglichen Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 durch die PKC $\iota$  sein, da diese in direktem Zusammenhang mit Pathologien im Herzen steht (Sato *et al.*, 2006; Adam *et al.*, 2007). Hierzu sollen Messungen zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach adenoviraler Expression der einzelnen PKC $\iota$ -Varianten Aufschluss geben, da eine gesteigerte Rac1 Aktivität eine erhöhte ROS-Produktion zur Folge hat (Takemoto *et al.*, 2001).

Als weiterer Aspekt ist die Identifizierung möglicher Rollen der PKC $\zeta$  in Kardiomyozyten geplant. Da bislang keine Hinweise auf identische oder

unterschiedliche Aufgaben der beiden  $\alpha$ PKCs in Kardiomyozyten existieren, bleibt zu klären, ob die zweite atypische Isoform PKC $\zeta$  in den Herzmuskelzellen dieselben Effekte verursacht, wie sie hier für die PKC $\iota$  gezeigt wurden.

Es wurden hierzu schon Adenoviren hergestellt, die die PKC $\zeta$  in zwei Transkriptvarianten enthalten. Durch Einfügen entsprechender Mutationen wurden auch hier konstitutiv-aktive und dominant-negative Formen konstruiert. Die Lokalisation sowie mögliche Auswirkungen in den Kardiomyozyten können so analog zu den hier erfolgten Experimenten untersucht werden.

Eine Möglichkeit um Langzeiteffekte beziehungsweise *in vivo* Effekte analysieren zu können, stellt die herzspezifische Expression der verschiedenen Varianten durch adenoassoziierte Viren (AAVs) dar. Bei der AAV-vermittelten Expression kommt es nicht zu Immunreaktionen der Tiere durch die Infektion. Durch Injektion der Viren eines speziellen herzspezifischen Serotyps in die Schwanzvene von Jungtieren kommt es zur Expression der gewünschten Proteine und die Tiere könnten dann im Erwachsenenalter untersucht werden. Denkbar wäre auch die Injektion von Viren ins Herz von Neonatalen, die bereits nach wenigen Wochen eine Expression aufweisen. Diese Experimente müssten allerdings an Mäusen stattfinden.

Solche Experimente bieten den Vorteil, dass die Tiere über einen längeren Zeitraum beobachtet und untersucht werden können. Veränderungen, deren Auswirkungen erst nach längerer Zeit deutlich werden, können an isolierten Zellen nicht identifiziert werden. Es könnten Rückschlüsse auf die Herzfunktion im lebenden Organismus getroffen werden, wenn die Tiere über einen Zeitraum mehrerer Wochen beobachtet werden. Dabei kann die Herzfunktion im Ultraschall und elektro-kardiographisch über mehrere Wochen kontinuierlich verfolgt werden.

### 6. Literaturverzeichnis

1. Adam O, Frost G, Custodis F, Sussman MA, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2007) Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 50:359-367
2. Adams JW and Brown JH (2001) G proteins and cardiac growth. *Oncogene* 20: 1626-1634
3. Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K, Ohno S (1994) A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem.* 269:12677-12683
4. Akimoto K, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K, Fukui Y, Osada S, Mizuno K, Hirai S, Kazlauskas A, Ohno S (1996) EGF or PDGF receptors activate atypical PKClambda through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.* 15:788-798
5. Backs J, Olson EN (2006) Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res.* 98:15-24
6. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP (2007) Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res.* 101:195-204
7. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205
8. Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 70:23-49
9. Bers DM, Bassani JW, Bassani RA (1996) Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 779:430-442
10. Bers DM, Guo T (2005) Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047:86-98

11. Bornancin F, Parker PJ (1997) Phosphorylation of protein kinase C- $\alpha$  on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem.* 272:3544-3549 Erratum in: *J Biol Chem* 272:13458
12. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ (1999) Increased protein kinase C activity and expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99:384-391
13. Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM (1997) Expression of protein kinase C  $\beta$  in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest.* 100:2189-2195
14. Boyle AJ, Kelly DJ, Zhang Y, Cox AJ, Gow RM, Way K, Itescu S, Krum H, Gilbert RE (2005) Inhibition of protein kinase C reduces left ventricular fibrosis and dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 39:213-221
15. Brandes R, Bers DM (1997) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ Res.* 80:82-87
16. Braun MU, Mochly-Rosen D (2003) Opposing effects of delta- and zeta-protein kinase C isozymes on cardiac fibroblast proliferation: use of isozyme-selective inhibitors. *J Mol Cell Cardiol.* 35:895-903
17. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD (2004) PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 10:248-254
18. Breitkreutz D, Braiman-Wiksman L, Daum N, Denning MF, Tennenbaum T (2007) Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133:793-808
19. Burkart EM, Sumandea MP, Kobayashi T, Nili M, Martin AF, Homsher E, Solaro RJ (2003) Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein

- kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity. *J Biol Chem.* 278:11265-11272
20. Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D (2001) Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11114-11119
  21. Churchill E, Budas G, Vallentin A, Koyanagi T, Mochly-Rosen D (2008) PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48:569-599
  22. Churchill EN, Qvit N, Mochly-Rosen D (2009) Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab.* 20:25–33
  23. Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I (2005) Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- $\alpha$  and - $\beta$ . *Diabetes* 54:85-91
  24. Díaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J (1996) The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86:777-786
  25. Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D (1994) Localization of Protein Kinase C Isozymes in Cardiac Myocytes. *Exp Cell Res.* 210:287-297
  26. Dorn GW II and Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 115:527–537
  27. Edwards AS, Newton AC (1997) Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem.* 272:18382-18390
  28. Farese RV, Sajan MP, Yang H, Li P, Mastorides S, Gower WR Jr, Nimal S, Choi CS, Kim S, Shulman GI, Kahn CR, Braun U, Leitges M (2007) Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J Clin Invest.* 117:2289-2301
  29. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, Unal O, Yun JK, Naides SJ, Kester M (2007) Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem.* 282:12450-12457

30. Fryer LG, Holness MJ, Decock JB, Sugden MC (1998) Cardiac protein kinase C expression in two models of cardiac hypertrophy associated with an activated cardiac renin-angiotensin system: effects of experimental hyperthyroidism and genetic hypertension (the mRen-2 rat). *J Endocrinol.* 158:27-33
31. Fu Y, Rubin CS (2011) Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep.* 12:785-796
32. Fukami K (2002) Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem.* 131:293-299
33. Gruver CL, DeMayo F, Goldstein MA, Means AR (1993) Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology* 33:376–388
34. Guo J, Gertsberg Z, Ozgen N, Sabri A, Steinberg SF (2011) Protein kinase D isoforms are activated in an agonist-specific manner in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 286:6500-6509
35. Hammer K, Ruppenthal S, Viero C, Scholz A, Edelmann L, Kaestner L, Lipp P (2010) Remodelling of Ca<sup>2+</sup> handling organelles in adult rat ventricular myocytes during long term culture. *J Mol Cell Cardiol.* 49:427-437
36. Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Matsuda T, Suzuki K, Inoue H, Matsumoto M, Ogawa W, Maeda S, Fujihara H, Ueta Y, Uchiyama Y, Akimoto K, Ohno S, Noda T, Kasuga M (2005) PKC $\lambda$  regulates glucose-induced insulin secretion through modulation of gene expression in pancreatic beta cells. *J Clin Invest.* 115:138-145
37. Hastie CJ, McLauchlan HJ, Cohen P (2006) Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc.* 1:968-971
38. Haworth RS, Cuello F, Herron TJ, Franzen G, Kentish JC, Gautel M, Avkiran M (2004) Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function. *Circ Res.* 95:1091-1099
39. Hellbert K, Kampf S, Maly K, Hochholdinger F, Mwanjewe J, Baier G, Uberall F, Grunicke HH (2000) Implication of atypical protein kinase C



- isozymes lambda and zeta in Ras mediated reorganization of the actin cytoskeleton and cyclin D1-induction. *Adv Enzyme Regul.* 40:49-62
40. Homma Y, Takenawa T, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K (1989) Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 164:406-412
41. House C, Kemp BE (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238:1726-1728
42. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Electrical+conduction+-system+of+the+heart>, Zugriff am 07.08.2011
43. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html#head1>, Zugriff am 07.08.2011
44. <http://www.transplantation-verstehen.de/dotAsset/25070.jpg>, Zugriff am 29.07.2011
45. [http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3\\_fluoreszenz/fluoreszenz\\_mikroskop/5\\_c\\_konfokal.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluoreszenz_mikroskop/5_c_konfokal.htm), Zugriff am 07.08.2011
46. Hudman D, Standen NB (2004) Protection from the effects of metabolic inhibition and reperfusion in contracting isolated ventricular myocytes via protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol.* 37:579-591
47. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279-284
48. Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* 6:477-480
49. Hwang JI, Oh YS, Shin KJ, Kim H, Ryu SH, Suh PG (2005) Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *Biochem J.* 389:181-186
50. Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y (2002) Tissue angiotensin II during progression of ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. *J Mol Cell Cardiol.* 34:1377-1385

51. Inagaki K, Koyanagi T, Berry NC, Sun L, Mochly-Rosen D (2008) Pharmacological inhibition of epsilon-protein kinase C attenuates cardiac fibrosis and dysfunction in hypertension-induced heart failure. *Hypertension*. 51:1565-1569
52. Jaken S, Parker PJ (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22:245-254
53. Johnson JE, Giorgione J, Newton AC (2000) The C1 and C2 Domains of Protein Kinase C Are Independent Membrane Targeting Modules, with Specificity for Phosphatidylserine Conferred by the C1 Domain. *Biochemistry* 39:11360-11369
54. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC (1995) Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*. 5:1394-1403
55. Kerkelä R, Ilves M, Pikkarainen S, Tokola H, Ronkainen J, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, Ruskoaho H (2002) Identification of PKC $\alpha$  isoform-specific effects in cardiac myocytes using antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Mol Pharmacol*. 62:1482-1491
56. Klauck TM, Faux MC, Labudda K, Langeberg LK, Jaken S, Scott JD (1996) Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271:1589-1592.
57. Kohout SC, Corbalán-García S, Torrecillas A, Gómez-Fernandéz JC, Falke JJ (2002) C2 domains of protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ : activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. *Biochemistry*. 41:11411-11424
58. Koide Y, Tamura K, Suzuki A, Kitamura K, Yokoyama K, Hashimoto T, Hirawa N, Kihara M, Ohno S, Umemura S (2003) Differential induction of protein kinase C isoforms at the cardiac hypertrophy stage and congestive heart failure stage in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*. 26:421-426
59. Kosloski LM, Bales IK, Allen KB, Walker BL, Borkon AM, Stuart RS, Pak AF, Wacker MJ (2009) Purification of cardiac myocytes from human heart biopsies for gene expression analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297:H1163-1169
60. Layland J, Solaro RJ, Shah AM (2005) Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res*. 66:12-21

61. Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, García JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD, Moscat J (2001) Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell.* 8:771-780
62. Li D, Yang B, Mehta JL (1999) Tumor necrosis factor-alpha enhances hypoxia-reoxygenation-mediated apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells: critical role of protein kinase C. *Cardiovasc Res.* 42:805-813
63. Lipp P, Reither G (2011) Protein Kinase C: The "Masters" of Calcium and Lipid. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004556
64. Liu SG, Wang BS, Jiang YY, Zhang TT, Shi ZZ, Yang Y, Yang YL, Wang XC, Lin DC, Zhang Y, Yang H, Cai Y, Zhan QM, Wang MR (2011) Atypical protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) promotes metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by enhancing resistance to Anoikis via PKC $\alpha$ -SKP2-AKT pathway. *Mol Cancer Res.* 9:390-402
65. Makowske M, Rosen OM (1989) Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *J Biol Chem.* 264:16155-16159
66. Malhotra A, Kang BP, Opawumi D, Belizaire W, Meggs LG (2001) Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem.* 225:97-107
67. Marian AJ (2006) Beta-adrenergic receptors signaling and heart failure in mice, rabbits and humans. *J Mol Cell Cardiol.* 41:11-13
68. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 101:365-376
69. Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inoue H, Miyake K, Furukawa K, Hayashi Y, Iguchi H, Matsuki Y, Hiramatsu R, Shimano H, Yamada N, Ohno S, Kasuga M, Noda T (2003) PKC $\lambda$  in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 112:935-944

70. McDonough PM, Glembotski CC (1992) Induction of natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation. *J. Biol. Chem.* 267:11665–11668
71. Mizukami Y, Hirata T, Yoshida K (1997) Nuclear translocation of PKC zeta during ischemia and its inhibition by wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett.* 401:247-251
72. Mizukami Y, Kobayashi S, Überall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K (2000) Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase  $\zeta$  during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem.* 275:19921-19927
73. Mochly-Rosen D (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268:247-251
74. Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J (1991) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3997-4000
75. Molkenin JD, Dorn GW II (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 63:391-426
76. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228
77. Moscat J, Diaz-Meco MT (2000) The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* 1:399-403
78. Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 268:13-16
79. Nakanishi H, Exton JH (1992) Purification and characterization of the zeta isoform of protein kinase C from bovine kidney. *J Biol Chem.* 267:16347-16354
80. Neri LM, Martelli AM, Borgatti P, Colamussi ML, Marchisio M, Capitani S (1999) Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC-zeta translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J.* 13:2299-2310

81. Newton AC (ed) (2003) Protein Kinase C Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 233, Humana Press
82. Newton AC (2001) Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. Chem. Rev. 101:2353-2364
83. Newton AC (2009) Lipid activation of protein kinases. J Lipid Res. 50:(Supplement) S266-S271
84. Newton AC (2010) Protein kinase C: poised to signal. Am J Physiol Endocrinol Metab 298:395-402
85. Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC (1997) Determination of the Specific Substrate Sequence Motifs of Protein Kinase C Isozymes. J Biol Chem. 272:952–960
86. Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. FASEB J. 9:484-496
87. Noda Y, Takeya R, Ohno S, Naito S, Ito T, Sumimoto H (2001) Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. Genes Cells. 6:107-119
88. Orr JW, Keranen LM, Newton AC (1992) Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. J Biol Chem. 267:15263-15266
89. Orr JW, Newton AC (1994) Intrapeptide regulation of protein kinase C. J Biol Chem. 269:8383-8387
90. Palaniyandi SS, Inagaki K, Mochly-Rosen D (2008) Mast cells and epsilonPKC: a role in cardiac remodeling in hypertension-induced heart failure. J Mol Cell Cardiol. 45:779-786
91. Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D (2009) Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? Cardiovascular Research 82:229–239
92. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN (2000) CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. J Clin Invest. 105:1395-1406

93. Perander M, Bjorkoy G, Johansen T (2001) Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C  $\lambda$ . *J Biol Chem.* 276:13015-13024
94. Pereira L, Matthes J, Schuster I, Valdivia HH, Herzig S, Richard S, Gómez AM (2006) Mechanisms of  $[Ca^{2+}]_i$  transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes.* 55:608-615
95. Pi Y, Zhang D, Kemnitz KR, Wang H, Walker JW (2003) Protein kinase C and A sites on troponin I regulate myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity and ATPase activity in the mouse myocardium. *J Physiol.* 552:845-857
96. Pu Y, Peach ML, Garfield SH, Wincovitch S, Marquez VE, Blumberg PM (2006) Effects on Ligand Interaction and Membrane Translocation of the Positively Charged Arginine Residues Situated along the C1 Domain Binding Cleft in the Atypical Protein Kinase C Isoforms. *J Biol Chem.* 281:33773–33788
97. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:856-862
98. Regala RP, Davis RK, Kunz A, Khor A, Leitges M, Fields AP (2009) Atypical protein kinase C $\iota$  is required for bronchioalveolar stem cell expansion and lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 69:7603-7611
99. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R (2010) Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res.* 1:269-280
100. Roman BB, Geenen DL, Leitges M, Buttrick PM (2001) PKC- $\beta$  is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H2264-2270
101. Saito N, Shirai Y (2002) Protein kinase C  $\gamma$  (PKC  $\gamma$ ): function of neuron specific isotype. *J Biochem.* 132:683-687
102. Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J (1999) The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* 18:3044-3053
103. Satoh M, Ogita H, Takeshita K, Mukai Y, Kwiatkowski DJ, Liao JK (2006) Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7432-7437

104. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA (2002) PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129:3533-3544
105. Schaeffer PJ, Desantiago J, Yang J, Flagg TP, Kovacs A, Weinheimer CJ, Courtois M, Leone TC, Nichols CG, Bers DM, Kelly DP (2009) Impaired contractile function and calcium handling in hearts of cardiac-specific calcineurin b1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297:H1263-1273
106. Scoote M, Williams AJ (2004) Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 322:1286-1309
107. Scotti ML, Bamlet WR, Smyrk TC, Fields AP, Murray NR (2010) Protein kinase Ciota is required for pancreatic cancer cell transformed growth and tumorigenesis. *Cancer Res*. 70:2064-2074
108. Shapira L, Sylvia VL, Halabi A, Soskolne WA, Van Dyke TE, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z (1997) Bacterial lipopolysaccharide induces early and late activation of protein kinase C in inflammatory macrophages by selective activation of PKC-epsilon. *Biochem Biophys Res Commun*. 240:629-634
109. Siedlecka U, Arora M, Kolettis T, Soppa GK, Lee J, Stagg MA, Harding SE, Yacoub MH, Terracciano CM (2008) Effects of clenbuterol on contractility and Ca<sup>2+</sup> homeostasis of isolated rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295:H1917-1926
110. Sil P, Kandaswamy V, Sen S (1998) Increased protein kinase C activity in myotrophin-induced myocyte growth. *Circ Res*. 82:1173-1188
111. Simonis G, Briem SK, Schoen SP, Bock M, Marquetant R, Strasser RH (2007) Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 305:103–111
112. Soloff RS, Katayama C, Lin MY, Feramisco JR, Hedrick SM (2004) Targeted deletion of protein kinase C lambda reveals a distribution of functions between the two atypical protein kinase C isoforms. *J Immunol*. 173:3250-3260

113. Stawowy P, Margeta C, Blaschke F, Lindschau C, Spencer-Hänsch C, Leitges M, Biagini G, Fleck E, Graf K (2005) Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 67:50-59
114. Stross C, Keitel V, Winands E, Häussinger D, Kubitz R (2009) Expression and localization of atypical PKC isoforms in liver parenchymal cells. *Biol Chem.* 390:235-244
115. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu SH (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep.* 41:415-434
116. Sumimoto H, Kamakura S, Ito T (2007) Structure and Function of the PB1 Domain, a Protein Interaction Module Conserved in Animals, Fungi, Amoebas, and Plants. *Sci. STKE* 2007:re6
117. Suzuki A, Akimoto K, Ohno S (2003) Protein kinase C lambda/iota (PKC $\lambda$ /iota): a PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *J Biochem.* 133:9-16
118. Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kemphues KJ, Miwa J, Ohno S (1998) Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125:3607-3614
119. Takahashi M, Mukai H, Oishi K, Isagawa T, Ono Y (2000) Association of immature hypophosphorylated protein kinase epsilon with an anchoring protein CG-NAP. *J Biol Chem.* 275:34592-34596
120. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK (2001) Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 108:1429-1437.
121. Terasawa H, Noda Y, Ito T, Hatanaka H, Ichikawa S, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F (2001) Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif. *The EMBO Journal* 20:3947-3956
122. Überall F, Hellbert K, Kampfer S, Maly K, Villunger A, Spitaler M, Mwanjewe J, Baier-Bitterlich G, Baier G, Grunicke HH (1999) Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in



- Ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 144:413-425
123. Vallentin A, Mochly-Rosen D (2007) RBCK1, a protein kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ )-interacting protein, regulates PKC $\beta$ -dependent function. *J Biol Chem.* 282:1650-1657
124. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0034
125. Viero C, Kraushaar U, Ruppenthal S, Kaestner L, Lipp P (2008) A primary culture system for sustained expression of a calcium sensor in preserved adult rat ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 43:59-71
126. Vijayan K, Szotek EL, Martin JL, Samarel AM (2004) Protein kinase C- $\alpha$ -induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:H2777-2789
127. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA, King GL (1997) Targeted overexpression of protein kinase C  $\beta$ 2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9320-9325
128. Wang C, Du JF, Wu F, Wang HC (2008) Apelin decreases the SR Ca $^{2+}$  content but enhances the amplitude of [Ca $^{2+}$ ] $_i$  transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H2540-2546
129. Wang G, Zhu X, Xie W, Han P, Li K, Sun Z, Wang Y, Chen C, Song R, Cao C, Zhang J, Wu C, Liu J, Cheng H (2010) Rad as a novel regulator of excitation-contraction coupling and beta-adrenergic signaling in heart. *Circ Res.* 106:317-327
130. Wang QJ (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 27:317-323
131. West MA, LeMieur T, Clair L, Bellingham J, Rodriguez JL (1997) Protein kinase C regulates macrophage tumor necrosis factor secretion: direct protein kinase C activation restores tumor necrosis factor production in endotoxin tolerance. *Surgery.* 122:204-211

132. Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL (2003) PB1 Domain-Mediated Heterodimerization in NADPH Oxidase and Signaling Complexes of Atypical Protein Kinase C with Par6 and p62. *Molecular Cell* 12:39–50
133. Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM (2007) Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res.* 77:452-462
134. Wu SC, Solaro RJ (2007) Protein kinase C zeta. A novel regulator of both phosphorylation and de-phosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *J Biol Chem.* 282:30691-30698
135. Yoshinaga S, Kohjima M, Ogura K, Yokochi M, Takeya R, Ito T, Sumimoto H, Inagaki F (2003) The PB1 domain and the PC motif-containing region are structurally similar protein binding modules. *The EMBO Journal* 22:4888-4897
136. Zhang T, Brown JH (2004) Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 63:476-486
137. Zhou G, Seibenhener ML, Wooten MW (1997) Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem.* 272:31130-31137

### 7. Danksagung

Bei allen, die mich während dieser schier endlos erscheinenden Zeit unterstützt haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Lipp. Vielen Dank für die Bereitstellung meines Promotionsthemas, die permanente fachliche und persönliche Unterstützung, diesen unbändigen Optimismus in den aussichtslosesten Situationen und fürs Immer-Da-Sein, wenn man Dich brauchte.

Eine ganz besondere Unterstützung war und ist mir Dr. Anke Scholz, die meine Betreuung übernommen hat und mir fachlich und freundschaftlich immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für Dein offenes Ohr in fachlichen und persönlichen Dingen, Deine ehrliche Meinung und die tolle Zeit, die wir zusammen hatten.

Dr. Sandra Ruppenthal danke ich ebenfalls für Ihre Unterstützung, die vielen hilfreichen Tipps, fruchtbaren Diskussionen und die freundschaftliche Kommunikation.

Dem gesamten Institut für Molekulare Zellbiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Tanja Kuhn für Ihre Unterstützung im Labor und Anne Vecerdea für die zahlreichen Rattenpräparationen. Bei Dr. Qinghai Tian bedanke ich mich besonders für die Programmierung und Bereitstellung der Igor- und Excel-Makros zur Auswertung der Kalzium- und Kontraktionsmessungen. Schön, dass es für alles jemanden gab, der sich damit auskannte.

Ein ganzes großes Dankeschön richtet sich an Dr. Franz Reither für die Entwicklung und Programmierung der komplexen Statistik zur Auswertung der qPCR-Daten. Sie haben mit mir nicht nur Ihr Talent zur einfachen Darstellung komplexer Sachverhalte, sondern auch sehr viel Geduld bewiesen. Dafür bedanke ich mich sehr herzlich.

Meinem Freund und meiner ganzen Familie, ganz besonders aber meinen Eltern danke ich für die einzigartige Unterstützung, die ich erfahren habe. Ihr wart immer für mich da und habt fest daran geglaubt, dass das mit mir und dem Doktor ein gutes Ende nimmt. Danke dafür und schön dass Ihr am Ende Recht behalten solltet.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name	Silke Wegener
Geburtsdatum/-ort	22. Dezember 1982, Zweibrücken
Anschrift	Ehlingerweg 16 66453 Gersheim

### Aus- und Weiterbildung

---

11.2007- 2012	<b>Promotion</b> Universität des Saarlandes Institut für Molekulare Zellbiologie  Titel der Doktorarbeit: <i>„Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zu G-Protein-gekoppelten Signalwegen in adulten Herzmuskelzellen“</i>
10.2009-10.2011	<b>Teilzeitstudium MBA „European Management“</b> Universität des Saarlandes, Europa-Institut  Abschluss: <b>Master of Business Administration</b>  Titel der Masterarbeit: <i>“Sustainability through strategic partnerships with NGOs in Europe”</i>
09.2008-06.2009	<b>Intensivkurs Betriebswirtschaftslehre und Weiterbildungsstudium „Betriebswirt/in (IWW)“</b> Institut für Wirtschaftswissenschaftliche Forschung und Weiterbildung GmbH Institut an der Fernuniversität Hagen  Abschluss: <b>Betriebswirtin (IWW)</b>

10.2002-09.2007

### **Studium Biochemie**

Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M.

Abschluss: **Diplom-Biochemikerin**

Titel der Diplomarbeit:

*„Einfluss der DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturfaktoren Ligase III, Ligase IV, PARP-1 und Ku70/80 auf die humane LINE-1 Retrotransposition“*

06.2002

Abitur

Von der Leyen-Gymnasium Blieskastel

### **Sprachen**

---

Deutsch

Muttersprache

Englisch

fließend

Französisch

Grundkenntnisse